

04. 3. 2004

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

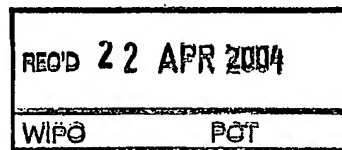
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 3 年   4 月 1 0 日  
Date of Application:

出 願 番 号            特 願 2 0 0 3 - 1 0 6 2 4 7  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P 2 0 0 3 - 1 0 6 2 4 7 ]

出   願   人            武 田 薬 品 工 業 株 式 会 社  
Applicant(s):

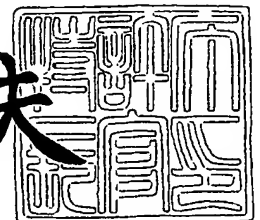


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年   4 月   9 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願  
【整理番号】 B03095  
【提出日】 平成15年 4月10日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 A61K 38/17

A61K 39/00  
A61K 48/00  
C07K 14/47  
C07K 16/18  
C12N 15/12  
G01N 33/53

## 【発明者】

【住所又は居所】 大阪府豊中市緑丘2丁目9-1-501

【氏名】 新谷 靖

## 【発明者】

【住所又は居所】 大阪府豊中市長興寺南1丁目4-14-303

【氏名】 太田 浩之

## 【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市東灘区住吉山手2丁目6-1 2-E

【氏名】 寺尾 寧子

## 【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市西区井吹台西町3丁目21-18

【氏名】 清田 義弘

## 【特許出願人】

【識別番号】 000002934

【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

## 【代理人】

【識別番号】 100114041

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 高橋 秀一

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100106323

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 関口 陽

## 【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2003- 56885

【出願日】 平成15年 3月 4日

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005142

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9909276

【包括委任状番号】 0203423

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 MIP-3 $\alpha$ 抑制薬の医薬用途および脳・神経細胞保護剤のスクリーニング方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号：2、4または6で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1以降のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩の活性を低下させる物質を含有してなる脳・神経細胞保護剤。

【請求項2】 活性を低下させる物質が、配列番号：2、4または6で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1以降のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する中和抗体である請求項1記載の脳・神経細胞保護剤。

【請求項3】 配列番号：2、4または6で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現を阻害する物質を含有してなる脳・神経細胞保護剤。

【請求項4】 発現を阻害する物質が、配列番号：2、4または6で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列に相補的な塩基配列またはその一部を含有する核酸である請求項3記載の脳・神経細胞保護剤。

【請求項5】 配列番号：2、4または6で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1以降のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる脳・神経細胞傷害の診断薬。

【請求項6】 配列番号：2、4または6で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸を含有してなる脳・神経細胞傷害の診断薬。

【請求項7】 配列番号：2、4または6で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1以降のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩と、それに対する受容体との結合を阻害する物質を



含有してなる脳・神経細胞保護剤。

【請求項 8】 配列番号：2、4 または 6 で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号 1 以降のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩に対する受容体の細胞刺激活性を阻害する物質を含有してなる脳・神経細胞保護剤。

【請求項 9】 配列番号：2、4 または 6 で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号 1 以降のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩に対する受容体をコードする遺伝子の発現を阻害する物質を含有してなる脳・神経細胞保護剤。

【請求項 10】 受容体が、配列番号 8 または 10 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩である請求項 7～9 のいずれかに記載の脳・神経細胞保護剤。

【請求項 11】 配列番号：2、4 または 6 で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号 1 以降のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする脳・神経細胞保護作用を有する物質のスクリーニング方法。

【請求項 12】 配列番号：8 または 10 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする脳・神経細胞保護作用を有する物質のスクリーニング方法。

【請求項 13】 配列番号：2、4 または 6 で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号 1 以降のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする脳・神経細胞保護作用を有する物質のスクリーニング用キット。

【請求項 14】 配列番号：8 または 10 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする脳・神経細胞保護作用を有する物質のスクリーニング用キット。

【請求項 15】 請求項 11 もしくは 12 記載のスクリーニング方法または

請求項 13 もしくは 14 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、脳・神経細胞保護作用を有する物質。

【請求項 16】 請求項 15 記載の物質を含有してなる脳・神経細胞保護剤。

【請求項 17】 配列番号：2、4 または 6 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸を用いることを特徴とする脳・神経細胞保護作用を有する物質のスクリーニング方法。

【請求項 18】 配列番号：8 または 10 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸を用いることを特徴とする脳・神経細胞保護作用を有する物質のスクリーニング方法。

【請求項 19】 配列番号：2、4 または 6 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸を含有することを特徴とする脳・神経細胞保護作用を有する物質のスクリーニング用キット。

【請求項 20】 配列番号：8 または 10 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸を含有することを特徴とする脳・神経細胞保護作用を有する物質のスクリーニング用キット。

【請求項 21】 請求項 17 もしくは 18 記載のスクリーニング方法または請求項 19 もしくは 20 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、脳・神経細胞保護作用を有する物質。

【請求項 22】 請求項 21 記載の物質を含有してなる脳・神経細胞保護剤。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【0001】

#### 【発明の属する技術分野】

本発明は、新規な脳・神経細胞保護剤、特に脳梗塞、脳出血、くも膜下出血な

どの脳血管障害、あるいは頭部外傷の予防および治療に有効な該保護剤に関する。本発明はまた、脳血管障害、頭部外傷等の脳・神経細胞傷害の診断薬に関する。さらに、本発明は、脳・神経細胞保護作用を有する物質のスクリーニング方法およびそのためのキットに関する。

#### 【0002】

##### 【従来の技術】

脳血管障害は、日米欧において死因の第2～3位、また重症後遺症の原因の第1位を占める医療経済的損失の大きい疾患である。現在のところ、一部の脳塞栓症および脳血栓症患者に対して積極的原因治療（t P A など）が行われているが、治療タイムウインドーの制限からその対象は患者全体の数パーセントにとどまっている。ほとんどの場合は、抗脳浮腫および再発・拡大抑制（抗血栓薬）を目的とした維持療法が施されるのみで根治、脳保護を目的とした有効な薬剤はない。

#### 【0003】

従来より、中枢神経系細胞が虚血ストレスに対して脆弱であることは良く認識されていることであり、脳虚血モデルを用いた基礎実験によると、神経細胞はわずか数分の虚血によっても不可逆的な障害を受けて死に至ると言われてきた。このことが脳卒中臨床の現場において大きな絶望感をもたらしてきたことは否めない。しかしながら近年、神経科学領域での精力的な研究により、虚血負荷時には個々の細胞レベルでの様々なストレス応答、神経細胞とグリア細胞間のクロストーク、さらにはプログラムされた細胞死など、解決できうる可能性を秘めた種々の側面が明らかにされてきており、より積極的な治療戦略の糸口に繋がるものとして大いに期待されている。

#### 【0004】

しかしながら、現在までに各種の作用機序を有する開発品、例えばグルタメート拮抗薬、カルシウム拮抗薬、抗酸化剤などが多数試みられてきたが、ことごとく臨床試験に失敗している。日本国内においては、抗酸化剤であるラジカット／RADICUT（登録商標、三菱ウェルファーマ社）が承認されているが、本剤は海外で上市されておらず、ワールドワイドな脳保護薬は未だないのが現状であ

る。

#### 【0005】

脳卒中患者の集中治療体制の充実にともない、臨床で有効性が見直された脳保護療法として脳低温療法がある。脳低温療法は、脳の温度（脳温）を32～35℃に低下させて維持するというものであり、顕著な脳保護効果があることから次第に注目を浴びるようになってきている。しかし、本療法は集中治療施設と複数の医療スタッフの24時間集中管理が求められるので、一般的な治療法としての普及は難しい。

#### 【0006】

遺伝子発現を網羅的に解析するために、cDNAまたはオリゴヌクレオチドを固定化したマイクロアレイ法が開発され、疾患特異的な遺伝子発現の変化を見出す技術が普及し、その有用性が確認されている。例えば、Affymetrix社のGeneChipシステムは、癌などの疾患の診断や創薬標的遺伝子の発見に多用されつつある。実際に、脳虚血に伴って特異的に発現が亢進される遺伝子やタンパク質、あるいは特異的に発現が抑制される遺伝子やタンパク質を見出し、そこから脳血管障害に対する治療薬や診断薬を創出する試みが行われている。例えば、インターロイキン1 $\beta$ （IL-1 $\beta$ ）や腫瘍壊死因子（TNF $\alpha$ ）などの炎症性サイトカインは脳虚血時の梗塞部位で発現が上昇していることが知られており、これらサイトカインに対する受容体拮抗剤は脳血管障害急性期治療薬として検討されている。

#### 【0007】

MIP-3 $\alpha$ （LARC（liver and activation-regulated chemokine）、Exodus、ST38、CCL20とも呼ばれる。本明細書においては「MIP-3 $\alpha$ 」と表記する）は、1997年に複数の研究室から報告されたCCケモカインの1種である（例えば、非特許文献1参照）。このタンパク質のラットホモログは、脳虚血モデルの脳皮質において発現が上昇する遺伝子として単離され、アレルギー性脳脊髄炎モデルにおいて、その発現は炎症の発症および治療効果と相関して増減することが報告されている（特許文献1、非特許文献2）。

また、MIP-3 $\alpha$ 受容体であるCCR6をノックアウトしたマウスでは腸で

の体液性免疫が低下することから、MIP-3 $\alpha$ /CCR6 シグナル伝達系がリンパ球の輸送および活性化に関与することが示唆されている（特許文献2）。

**【0008】****【特許文献1】**

国際公開第98/49309号パンフレット

**【特許文献2】**

国際公開第01/17558号パンフレット

**【非特許文献1】**

ヒエシマ (Hieshima) ら, 「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.)」, 米国, 1997年, 第272巻, p.5846-5853

**【非特許文献2】**

ウータンスーシュナイツ (Utans-Schneitz) ら, 「ジャーナル・オブ・ニューロイムノロジー (J. Neuroimmunol.)」, 蘭国, 1998年, 第92巻, p.179-190

**【0009】****【発明が解決しようとする課題】**

現在、脳血管障害の治療は、ほとんどの場合X線CTまたはMRI画像診断などの確定診断を待って行う必要があり、そのことが治療タイムウインドーを制限している。従って、病型を選ばず、確定診断を必要としない新規な脳血管障害予防・治療手段の確立が切望されている。

本発明の目的は、安全で優れた脳血管障害の予防・治療剤を提供することである。また、本発明の別の目的は、脳血管障害の予防・治療効果を有する物質の簡便かつ有効なスクリーニング方法を提供することである。

**【0010】****【課題を解決するための手段】**

本発明者らは、上記の目的を達成するために、ラット脳虚血モデルを用いて低体温療法の特性を検証するとともに、マイクロアレイ法を用いて低体温療法の主作用機序を担うと考えられるターゲット遺伝子を追求した。その結果、脳虚血ラットモデルにおいて一過性局所虚血後の再灌流時に顕著に発現が増加し、かつ低

体温処置を施すことによって脳保護効果と並行して発現誘導が著しく抑制される遺伝子としてMIP-3 $\alpha$ 遺伝子を見出した。

さらに、本発明者らは、脳虚血ラットの脳室内に抗MIP-3 $\alpha$ 抗体を投与してMIP-3 $\alpha$ の活性を抑制することにより、梗塞体積が著しく縮小することを確認した。

また、本発明者らは、ラットCCR6遺伝子を新たにクローニングし、得られたcDNAの塩基配列を基にPCR法によりラット局所脳虚血モデルでの脳組織におけるCCR6遺伝子の発現と低体温処置による発現減少の有無を調べた結果、CCR6遺伝子は一過性局所虚血後の再灌流時に顕著に発現が増加し、低体温処置による脳保護効果と並行して発現が著しく抑制されることを見出した。本発明者らは、これらの知見に基づいてさらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

#### 【0011】

すなわち、本発明は、

[1] 配列番号：2、4または6で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1以降のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩の活性を低下させる物質を含有してなる脳・神経細胞保護剤、

[2] 活性を低下させる物質が、配列番号：2、4または6で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1以降のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する中和抗体である上記[1]記載の脳・神経細胞保護剤、

[3] 配列番号：2、4または6で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードする遺伝子の発現を阻害する物質を含有してなる脳・神経細胞保護剤、

[4] 発現を阻害する物質が、配列番号：2、4または6で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列に相補的な塩基配列またはその一部を含有する核酸である上記[3]記載の脳・神経細胞保護剤、

[5] 配列番号：2、4または6で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1以

降のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる脳・神経細胞傷害の診断薬、

[6] 配列番号: 2、4 または 6 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸を含有してなる脳・神経細胞傷害の診断薬、

[7] 配列番号: 2、4 または 6 で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号 1 以降のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩と、それに対する受容体との結合を阻害する物質を含有してなる脳・神経細胞保護剤、

[8] 配列番号: 2、4 または 6 で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号 1 以降のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩に対する受容体の細胞刺激活性を阻害する物質を含有してなる脳・神経細胞保護剤、

[9] 配列番号: 2、4 または 6 で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号 1 以降のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩に対する受容体をコードする遺伝子の発現を阻害する物質を含有してなる脳・神経細胞保護剤、

[10] 受容体が、配列番号 8 または 10 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩である上記 [7] ~ [9] のいずれかに記載の脳・神経細胞保護剤、

[11] 配列番号: 2、4 または 6 で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号 1 以降のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする脳・神経細胞保護作用を有する物質のスクリーニング方法、

[12] 配列番号: 8 または 10 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする脳・神経細胞保護作用を有する物質のスクリーニング方法、

[13] 配列番号：2、4または6で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1以降のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする脳・神経細胞保護作用を有する物質のスクリーニング用キット、

[14] 配列番号：8または10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする脳・神経細胞保護作用を有する物質のスクリーニング用キット、

[15] 上記[11]もしくは[12]記載のスクリーニング方法または上記[13]もしくは[14]記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、脳・神経細胞保護作用を有する物質、

[16] 上記[15]記載の物質を含有してなる脳・神経細胞保護剤、

[17] 配列番号：2、4または6で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸を用いることを特徴とする脳・神経細胞保護作用を有する物質のスクリーニング方法、

[18] 配列番号：8または10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸を用いることを特徴とする脳・神経細胞保護作用を有する物質のスクリーニング方法、

[19] 配列番号：2、4または6で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸を含有することを特徴とする脳・神経細胞保護作用を有する物質のスクリーニング用キット、

[20] 配列番号：8または10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸を含有することを特徴とする脳・神経細胞保護作用を有する物質のスクリーニング用キット、

[21] 上記[17]もしくは[18]記載のスクリーニング方法または上記



[19] もしくは [20] 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、  
脳・神経細胞保護作用を有する物質、および

[22] 上記 [21] 記載の物質を含有してなる脳・神経細胞保護剤、  
などを提供する

## 【0012】

### 【発明の実施の形態】

本発明は、MIP-3 $\alpha$ 抑制薬を含有してなる脳・神経細胞保護剤に関する。  
ここで「MIP-3 $\alpha$ 」とは、配列番号：2、4または6で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1以降のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をいい、「MIP-3 $\alpha$ 抑制薬」とは、MIP-3 $\alpha$ の発現および／または活性を直接的もしくは間接的に低下させる物質をいう。また、「脳・神経細胞保護」とは、細胞傷害を受けた、あるいは受けるおそれのある脳細胞および／または神経細胞が細胞死に至るのを阻止する（もしくは少なくとも遅延させる）作用をいい、細胞傷害の原因等には特に制限されない。

配列番号：2、4または6で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1以降のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質（以下、「本発明のMIP-3 $\alpha$ 」または単に「MIP-3 $\alpha$ 」と称することもある）は、ヒトまたは他の温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞〔例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓 $\beta$ 細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など〕もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織〔例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下

腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など] に由来するタンパク質であってもよく、また、化学合成もしくは無細胞翻訳系で合成されたタンパク質であってもよい。あるいは上記アミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドを導入された形質転換体から産生された組換えタンパク質であってもよい。

### 【0013】

配列番号：2、4 または 6 で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号 1 以降のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：2、4 または 6 で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号 1 以降のアミノ酸配列のいずれかと約 50% 以上、好ましくは約 60% 以上、さらに好ましくは約 70% 以上、より好ましくは約 80% 以上、特に好ましくは約 90% 以上、最も好ましくは約 95% 以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：2、4 または 6 で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号 1 以降のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：2、4 または 6 で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号 1 以降のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：2、4 または 6 で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号 1 以降のアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

### 【0014】

実質的に同質の活性としては、例えば、シグナル情報伝達活性、受容体結合活性などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの性質が性質的に（例、生理学的に、または薬理学的に）同質であることを示す。したがって、シグナル情報伝達活性または受容体結合活性が同等（例、約 0.01～100 倍、好ましくは約 0.1～10 倍、より好ましくは 0.5～2 倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

シグナル情報伝達活性の測定は、自体公知の方法に準じて行う。例えば、CCR6 発現細胞に対する刺激活性（例えば、CCR6 を介した細胞内 cAMP 濃度の上昇、細胞内  $Ca^{2+}$  の遊離、イノシトールリン酸の産生、細胞膜電位の変動、細胞内蛋白質のリン酸化もしくは脱リン酸化、c-fos の活性化、pH の低

下などを促進する活性または抑制する活性)を、公知の方法により測定する。具体的には、CCR6をコードするDNAを挿入したプラスミドを、例えばチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞(例、CHO-K1細胞; ジャーナル・オブ・イクスペリメンタル・メディシン(J. Exp. Med.) 108巻、945頁、1958年に記載)に導入し、CCR6を高発現させたCHO-K1細胞を、MIP-3 $\alpha$ の存在下で培養し、細胞膜上に発現したCCR6を介するシグナル情報伝達活性(例えば、細胞内cAMP濃度の上昇もしくは低下、細胞内Ca<sup>2+</sup>の遊離、イノシトールリン酸の産生、細胞膜電位の変動、細胞内蛋白質のリン酸化もしくは脱リン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を公知の方法により測定する。

受容体結合活性の測定は、自体公知の方法に準じて行うことができる。例えば、(1) 標識したMIP-3 $\alpha$ タンパク質をCCR6を発現する細胞または該細胞の膜画分に接触させ、標識したMIP-3 $\alpha$ タンパク質の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定する、(2) 標識したMIP-3 $\alpha$ タンパク質を、CCR6タンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した該タンパク質に接触させ、標識したMIP-3 $\alpha$ の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定することにより受容体結合活性が測定できる。

上記の活性測定で使用されるCCR6をコードするDNAとしては、配列番号8または10あるいは配列番号14で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAが挙げられる(例えば、Babaら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.) 272巻、14893-14898頁、1997年参照)。

#### 【0015】

また、本発明のMIP-3 $\alpha$ としては、例えば、①配列番号: 2、4または6で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1以降のアミノ酸配列のうち、1または2個以上(好ましくは、1~30個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5)個)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号: 2、4または6で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1以降のアミノ酸配列

に、1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：2、4または6で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1以降のアミノ酸配列に、1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、④配列番号：2、4または6で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1以降のアミノ酸配列のうち、1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または⑤それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテインも含まれる。

上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、とくに限定されない。

#### 【0016】

本明細書におけるタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：2、4または6で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1以降のアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする本発明のMIP-3 $\alpha$ は、C末端がカルボキシル基（-COOH）、カルボキシレート（-COO<sup>-</sup>）、アミド（-CONH<sub>2</sub>）またはエステル（-COOR）の何れであってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチルなどのC<sub>1</sub>-6アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC<sub>3</sub>-8シクロアルキル基、例えば、フェニル、 $\alpha$ -ナフチルなどのC<sub>6</sub>-12アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C<sub>1</sub>-2アルキル基もしくは $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル-C<sub>1</sub>-2アルキル基などのC<sub>7</sub>-14アラルキル基、ピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明のMIP-3 $\alpha$ がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のMIP-3 $\alpha$ に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば

上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明で用いられるタンパク質には、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC<sub>1</sub>－6アルカノイルなどのC<sub>1</sub>－6アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば－OH、－SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC<sub>1</sub>－6アルカノイル基などのC<sub>1</sub>－6アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明のMIP-3 $\alpha$ の好ましい具体例としては、例えば、配列番号：2で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～70で示されるアミノ酸配列からなる成熟ヒトMIP-3 $\alpha$ 、配列番号：4で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～71で示されるアミノ酸配列からなる成熟ラットMIP-3 $\alpha$ 、または配列番号：6で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1～70で示されるアミノ酸配列からなる成熟マウスMIP-3 $\alpha$ などがあげられる。

#### 【0017】

本発明のMIP-3 $\alpha$ の部分ペプチドとしては、前記した本発明のMIP-3 $\alpha$ の部分アミノ酸配列を有するペプチドであって、好ましくは、本発明のMIP-3 $\alpha$ と実質的に同質の活性を有するものであればいずれのものでもよい。実質的に同質の活性としては、例えば、シグナル情報伝達活性、受容体結合活性、エピトープ活性などが挙げられる。実質的に同質とは上記と同義である。

例えば、本発明のMIP-3 $\alpha$ の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは30個以上、さらに好ましくは40個以上、より好ましくは50個以上の部分アミノ酸配列を有するペプチドなどが用いられる。

また、本発明のMIP-3 $\alpha$ の部分ペプチドは、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1

～5) 個) のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上(好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1～5) 個) のアミノ酸が挿入され、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数(1～5) 個程度) のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

#### 【0018】

また、本発明のMIP-3 $\alpha$ の部分ペプチドはC末端がカルボキシル基(—COOH)、カルボキシレート(—COO<sup>—</sup>)、アミド(—CONH<sub>2</sub>)またはエステル(—COOR)の何れであってもよい。ここでエステルにおけるRとしては、本発明のMIP-3 $\alpha$ について前記したと同様のものが挙げられる。本発明のMIP-3 $\alpha$ の部分ペプチドがC末端以外にカルボキシル基(またはカルボキシレート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも該部分ペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、該部分ペプチドには、前記した本発明のMIP-3 $\alpha$ と同様に、N末端のアミノ酸残基(例、メチオニン残基)のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明のMIP-3 $\alpha$ の部分ペプチドは抗体作成のための抗原としても用いることができる。

#### 【0019】

本発明のMIP-3 $\alpha$ またはその部分ペプチドは遊離体であっても、塩の形態であってもよい。塩としては、酸または塩基との生理学的に許容される塩が挙げられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼ

ンスルホン酸) との塩などが用いられる。

#### 【0020】

本発明のMIP-3 $\alpha$ またはその塩は、前述したヒトまたは他の温血動物の細胞または組織から自体公知のタンパク質の精製方法によって製造することができる。具体的には、ヒトや他の温血動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

#### 【0021】

本発明のMIP-3 $\alpha$ もしくはその部分ペプチドまたはその塩、またはそのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル) フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル) フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質または部分ペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル) カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤(例えば、HOBt, HOOBt)とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHO

Bt エステルあるいはHOObt エステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

### 【0022】

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N-ジメチルホルムアミド, N, N-ジメチルアセトアミド, N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン, クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン, ジオキサン, テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル, プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル, 酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃~50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5~4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

### 【0023】

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ベンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシ基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、



プロピル、ブチル、*t*-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化)、アラルキルエステル化(例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化)、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、*t*-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級(C<sub>1</sub>-6)アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、*t*-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bz1、Cl2-Bz1、2-ニトロベンジル、Br-Z、*t*-ブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

#### 【0024】

保護基の除去(脱離)方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃~40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基とし

て用いられる 2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の 1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

#### 【0025】

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

#### 【0026】

タンパク質または部分ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の  $\alpha$ -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖の N 末端の  $\alpha$ -アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質または部分ペプチドと C 末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質または部分ペプチドとを製造し、これらのタンパク質またはペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質またはペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質またはペプチドを得ることができる。この粗タンパク質またはペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質またはペプチドのアミド体を得ることができる。

タンパク質またはペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の  $\alpha$ -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質またはペプチドのアミド体と同様にして、所望のタンパク

質またはペプチドのエステル体を得ることができる。

### 【0027】

本発明のMIP-3 $\alpha$ の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のMIP-3 $\alpha$ を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のMIP-3 $\alpha$ の部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuebke、ザ・ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の前製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて該部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

### 【0028】

さらに、本発明のMIP-3 $\alpha$ またはその部分ペプチドは、本発明のMIP-3 $\alpha$ またはその部分ペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を培養し、得られる培養物から本発明のMIP-3 $\alpha$ またはその部分ペプチドを分離精製することによって製造することもできる。あるいは、本発明のMIP-3 $\alpha$ また

はその部分ペプチドは、該DNAに対応するRNAを鋳型として、ウサギ網状赤血球ライセート、コムギ胚芽ライセート、大腸菌ライセートなどからなる無細胞蛋白質翻訳系を用いてインビトロ翻訳することによっても合成することができる。あるいは、さらにRNAポリメラーゼを含む無細胞転写／翻訳系を用いて、該DNAを鋳型としても合成することができる。

#### 【0029】

本発明のMIP-3 $\alpha$ またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、前述した本発明のMIP-3 $\alpha$ またはその部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。好ましくはDNAである。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する) によって増幅することもできる。

#### 【0030】

本発明のMIP-3 $\alpha$ をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：1、3または5で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：1、3または5で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、前記した配列番号：2、4または6で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1以降のアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

#### 【0031】

配列番号：1、3または5で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：1、3または5で表される塩基配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、

最も好ましくは約 95%以上の相同性を有する塩基配列を含有する DNA などが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約 19~40 mM、好ましくは約 19~20 mM で、温度が約 50~70℃、好ましくは約 60~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約 19 mM で温度が約 65℃の場合が最も好ましい。

より好ましくは、本発明の MIP-3 $\alpha$  をコードする DNA は、配列番号: 1、3 または 5 で表される塩基配列を含有する DNA である。

#### 【0032】

本発明の MIP-3 $\alpha$  の部分ペプチドをコードする DNA は、配列番号 2、4 または 6 で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号 1 以降のアミノ酸配列の一部と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含み、前記した本発明の MIP-3 $\alpha$  と実質的に同質の活性 (例、シグナル情報伝達活性、受容体結合活性、エピトープ活性など) を有するペプチドをコードする DNA であればいかなるものであってもよい。また、ゲノム DNA、ゲノム DNA ライブラリー、上記した細胞・組織由来の cDNA、上記した細胞・組織由来の cDNA ライブラリー、合成 DNA のいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞・組織より mRNA 画分を調製したものをを用いて直接 RT-PCR 法によって増幅することもできる。

#### 【0033】

具体的には、本発明の MIP-3 $\alpha$  の部分ペプチドをコードする DNA としては、例えば、(1) 配列番号 1、3 または 5 で表される塩基配列を有する DNA

の部分塩基配列を有するDNA、または(2)配列番号1、3または5で表される塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、該DNAにコードされるアミノ酸配列を含むタンパク質と実質的に同質の活性(例:シグナル情報伝達活性、受容体結合活性、エピトープ活性など)を有するペプチドをコードするDNAなどが用いられる。

配列番号:1、3または5で表される塩基配列とハイブリダイズできるDNAは、前記と同意義を示す。

ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。

#### 【0034】

本発明のMIP-3 $\alpha$ またはその部分ペプチドをコードするDNAは、該タンパク質またはペプチドをコードする塩基配列の一部を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを、本発明のMIP-3 $\alpha$ の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを標識したものとハイブリダイゼーションすることによってクローニングすることができる。ハイブリダイゼーションは、例えば、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)第2版(前述)に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、ハイブリダイゼーションは、該ライブラリーに添付された使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

#### 【0035】

DNAの塩基配列は、公知のキット、例えば、Mutan<sup>TM</sup>-super Express Km(宝酒造(株))、Mutan<sup>TM</sup>-K(宝酒造(株))等を用いて、ODA-LA PCR法、Gapped duplex法、Kunkel法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って変換することができる。

#### 【0036】

クローン化されたDNAは、目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化するか、リンカーを付加した後に、使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳

終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することができる。

### 【0037】

本発明のMIP-3 $\alpha$ またはその部分ペプチドをコードするDNAを含有する発現ベクターは、例えば、(イ) 本発明のMIP-3 $\alpha$ またはその部分ペプチドをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13); 枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194); 酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15);  $\lambda$ ファージなどのバクテリオファージ; レトロウイルス, ワクシニアウイルス, バキュロウイルスなどの動物ウイルス; pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNA1/Neoなどが用いられる。

プロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。

例えば、宿主が動物細胞である場合、SR $\alpha$ プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV (サイトメガロウイルス) プロモーター、HSV-TKプロモーターなどが用いられる。なかでも、CMVプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどが好ましい。

宿主がエシェリヒア属菌である場合、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 $\lambda$ PLプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが好ましい。

宿主がバチルス属菌である場合、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなどが好ましい。

宿主が酵母である場合、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。

宿主が昆虫細胞である場合、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーター

などが好ましい。

### 【0038】

発現ベクターには、上記の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp<sup>r</sup>と略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo<sup>r</sup>と略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用い、dhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によって選択することもできる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、ネイティブなシグナル配列（例えば、配列番号：2、4または6で表されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1以前のアミノ酸配列など）の代わりに、本発明のMIP-3 $\alpha$ またはその部分ペプチドのN端末側に付加してもよい。宿主がエシェリヒア属菌である場合、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが；宿主がバチルス属菌である場合、 $\alpha$ -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが；宿主が酵母である場合、MF $\alpha$ ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列などが；宿主が動物細胞である場合、インシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ用いられる。

### 【0039】

上記のようにして得られる「本発明のMIP-3 $\alpha$ またはその部分ペプチドをコードするDNA」を含有する形質転換体は、公知の方法に従い、該DNAを含有する発現ベクターで、宿主を形質転換することによって製造することができる。ここで、発現ベクターとしては、前記したものが挙げられる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ（Escheric



hia coli) K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクレック・アシックス・リサーチ (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティクス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (Bacillus subtilis) MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) AH22, AH22R-, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (Schizosaccharomyces pombe) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (Pichia pastoris) KM71 などが用いられる。

#### 【0040】

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (Spodoptera frugiperda cell; Sf細胞)、Trichoplusia niの中腸由来のMG1細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh Five<sup>TM</sup>細胞、Mamestra brassicae由来の細胞またはEstigmena acrea由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (Bombyx mori N細胞; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハ

ムスター細胞 CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞 CHO (以下、CHO (dhfr-) 細胞と略記), マウス L細胞, マウス At T-20, マウスミエローマ細胞, マウス ATDC5細胞, ラット GH3, ヒト FL細胞などが用いられる。

#### 【0041】

形質転換は、宿主の種類に応じ、公知の方法に従って実施することができる。

エシェリヒア属菌は、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って形質転換することができる。

バチルス属菌は、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って形質転換することができる。

酵母は、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187(1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って形質転換することができる。

昆虫細胞および昆虫は、例えば、バイオ／テクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って形質転換することができる。

動物細胞は、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコル, 263-267(1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って形質転換することができる。

#### 【0042】

形質転換体の培養は、宿主の種類に応じ、公知の方法に従って実施することができる。

例えば、宿主がエシェリヒア属菌またはバチルス属菌である形質転換体を培養する場合、培養に使用される培地としては液体培地が好ましい。また、培地は、形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物などを含有することが好まし

い。ここで、炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖などが；窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質が；無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがそれぞれ挙げられる。また、培地には、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地の pH は、好ましくは約 5～8 である。

宿主がエシェリヒア属菌である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含む M9 培地〔ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。必要により、プロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3 $\beta$ -インドリルアクリル酸のような薬剤を培地に添加してもよい。

宿主がエシェリヒア属菌である形質転換体の培養は、通常約 15～43℃で、約 3～24 時間行なわれる。必要により、通気や攪拌を行ってもよい。

宿主がバチルス属菌である形質転換体の培養は、通常約 30～40℃で、約 6～24 時間行なわれる。必要により、通気や攪拌を行ってもよい。

宿主が酵母である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地〔Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77 巻, 4505 (1980)] や 0.5% カザミノ酸を含有する SD 培地〔Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81 巻, 5330 (1984)] などが挙げられる。培地の pH は、好ましくは約 5～8 である。培養は、通常約 20℃～35℃で、約 24～72 時間行なわれる。必要に応じて、通気や攪拌を行ってもよい。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する場合の培地としては、

例えば Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)) に非働化した 10% ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地の pH は、好ましくは約 6.2 ~ 6.4 である。培養は、通常約 27℃ で、約 3 ~ 5 日間行なわれる。必要に応じて通気や攪拌を行ってもよい。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えば、約 5 ~ 20% の胎児牛血清を含む MEM 培地 [サイエンス (Science), 122 巻, 501 (1952)], DMEM 培地 [ウイルス学 (Virology), 8 巻, 396 (1959)], RPMI 1640 培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199 巻, 519 (1967)], 199 培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73 巻, 1 (1950)] などが用いられる。培地の pH は、好ましくは約 6 ~ 8 である。培養は、通常約 30℃ ~ 40℃ で、約 15 ~ 60 時間行なわれる。必要に応じて通気や攪拌を行ってもよい。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明の MIP-3 $\alpha$  またはその部分ペプチドを生成せしめることができる。

#### 【0043】

上記培養物から本発明の MIP-3 $\alpha$  またはその部分ペプチドを分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明の MIP-3 $\alpha$  またはその部分ペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりタンパク質 (ペプチド) の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトン X-100 TM などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にタンパク質 (ペプチド) が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるタンパク質（ペプチド）の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、および SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

#### 【0044】

かくして得られるタンパク質（ペプチド）が遊離体の場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生するタンパク質（ペプチド）を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明の MIP-3 $\alpha$  またはその部分ペプチドの存在は、それらに対する特異的抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウエスタンブロットティングなどにより測定することができる。

#### 【0045】

さらに、本発明の MIP-3 $\alpha$  またはその部分ペプチドは、上記の本発明の MIP-3 $\alpha$  またはその部分ペプチドをコードする DNA に対応する RNA を鋳型として、ウサギ網状赤血球ライセート、コムギ胚芽ライセート、大腸菌ライセートなどからなる無細胞蛋白質翻訳系を用いてインビトロ翻訳することによっても合成することができる。あるいは、さらに RNA ポリメラーゼを含む無細胞転写／翻訳系を用いて、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードする DNA

を鋳型としても合成することができる。

#### 【0046】

後記実施例において示される通り、MIP-3 $\alpha$ は脳虚血時にその遺伝子発現が顕著に上昇し、低体温療法による治療効果と相関して著しく減少する。さらにMIP-3 $\alpha$ に対する中和抗体の投与により脳虚血モデルにおける梗塞体積が顕著に縮小することから、本発明のMIP-3 $\alpha$ 抑制薬は、脳・神経細胞保護効果、特に脳血管障害や頭部外傷に際しての脳・神経細胞保護効果を有する。したがって、該物質は、脳細胞・神経細胞を細胞傷害から保護することが予防・治療上有効な疾患、好ましくは脳血管障害（例、脳梗塞、脳出血、くも膜下出血など）や頭部外傷の予防・治療に有用である。

#### 【0047】

従って、MIP-3 $\alpha$ 抑制薬（これらの物質は塩を形成していてもよく、該塩の具体例としては、前記した本発明のMIP-3 $\alpha$ の塩と同様のものが挙げられる）は、必要により薬理学的に許容し得る担体と混合して医薬組成物とした後に、脳・神経細胞保護剤として用いることができる。

#### 【0048】

MIP-3 $\alpha$ 抑制薬のうち、MIP-3 $\alpha$ の活性を低下させる物質としては、例えば、MIP-3 $\alpha$ またはその部分ペプチドに対する中和抗体、MIP-3 $\alpha$ またはその受容体の拮抗薬、シグナル情報伝達阻害物質、受容体の発現を阻害する物質、MIP-3 $\alpha$ の不活性化機構を刺激する物質、MIP-3 $\alpha$ の分解または代謝を亢進させる物質、あるいはそれらを活性化させる物質などが挙げられるが、それらに限定されない。

#### 【0049】

好ましい一実施態様としては、MIP-3 $\alpha$ の活性を低下させる物質は、上記した本発明のMIP-3 $\alpha$ もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体である。

本発明のMIP-3 $\alpha$ もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、それらを認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。また、該抗体は、抗体分子そのものであってもよいし、

抗体分子の  $F(ab')_2$ 、 $Fab'$ 、 $Fab$  画分、あるいは可変領域の軽鎖と重鎖をリンカーで連結した単鎖抗体 ( $scFv$ ) 等であってもよい。

#### 【0050】

本発明の  $MIP-3\alpha$  もしくはその部分ペプチドまたはその塩（以下、抗体の説明においては、これらを包括して単に「本発明の  $MIP-3\alpha$ 」と略記する場合がある）に対する抗体は、本発明の  $MIP-3\alpha$  を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

#### 【0051】

〔モノクローナル抗体の作製〕

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明の  $MIP-3\alpha$  は、非ヒト温血動物に対して、投与により抗体産生が可能な部位に、それ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常 2～6 週毎に 1 回ずつ、計 2～10 回程度行われる。用いられる非ヒト温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の 2～5 日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化タンパク質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウイルスなどが挙げられるが、好ましくは PEG が用いられる。

#### 【0052】

骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1 な

どの温血動物の骨髓腫細胞が挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:1～20:1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000～PEG6000）が10～80%程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、抗原タンパク質（ペプチド）を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したタンパク質（ペプチド）を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

### 【0053】

#### （b）モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イ



オン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

#### 【0054】

##### 〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のMIP-3 $\alpha$ に対するポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質またはペプチド）自体、あるいはそれとキャリアタンパク質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアタンパク質との複合体に関し、キャリアタンパク質の種類およびキャリアとハプテンとの混合比は、キャリアに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナ

ル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

#### 【0055】

本発明の抗体を含有する脳・神経細胞保護剤は低毒性であり、そのまま液剤として、または薬理学的に許容し得る担体と混合して適当な剤形の医薬組成物とした後に、ヒトまたは他の哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的（例、関節内投与）に投与することができる。

ここで、薬理学的に許容される担体としては、製剤素材として慣用の各種有機あるいは無機担体物質が用いられ、固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤；液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤などとして配合される。また必要に応じて、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤などの製剤添加物を用いることもできる。

#### 【0056】

賦形剤の好適な例としては、乳糖、白糖、D-マンニトール、D-ソルビトール、デンプン、 $\alpha$ 化デンプン、デキストリン、結晶セルロース、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、アラビアゴム、デキストリン、プルラン、軽質無水ケイ酸、合成ケイ酸アルミニウム、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどが挙げられる。

滑沢剤の好適な例としては、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、コロイドシリカなどが挙げられる。

結合剤の好適な例としては、 $\alpha$ 化デンプン、ショ糖、ゼラチン、アラビアゴム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、結晶セルロース、白糖、D-マンニトール、トレハロース、デキストリン、プルラン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。

崩壊剤の好適な例としては、乳糖、白糖、デンプン、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、クロスカルメロースナトリウム、カルボキシメチルスターチナトリウム、軽質無水ケイ酸、低置換度ヒドロキシ

プロピルセルロースなどが挙げられる。

溶剤の好適な例としては、注射用水、生理的食塩水、リンゲル液、アルコール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ゴマ油、トウモロコシ油、オリーブ油、綿実油などが挙げられる。

溶解補助剤の好適な例としては、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、D-マンニトール、トレハロース、安息香酸ベンジル、エタノール、トリスアミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、サリチル酸ナトリウム、酢酸ナトリウムなどが挙げられる。

懸濁化剤の好適な例としては、ステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリンなどの界面活性剤；例えばポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースなどの親水性高分子；ポリソルベート類、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油などが挙げられる。

等張化剤の好適な例としては、塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトール、D-ソルビトール、ブドウ糖などが挙げられる。

緩衝剤の好適な例としては、リン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩などの緩衝液などが挙げられる。

無痛化剤の好適な例としては、ベンジルアルコールなどが挙げられる。

防腐剤の好適な例としては、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸などが挙げられる。

抗酸化剤の好適な例としては、亜硫酸塩、アスコルビン酸塩などが挙げられる。

。

着色剤の好適な例としては、水溶性食用タール色素（例、食用赤色 2 号及び 3 号、食用黄色 4 号及び 5 号、食用青色 1 号及び 2 号などの食用色素、水不溶性レキ色素（例、前記水溶性食用タール色素のアルミニウム塩など）、天然色素（例、 $\beta$ -カロチン、クロロフィル、ベンガラなど）などが挙げられる。

甘味剤の好適な例としては、サッカリンナトリウム、グリチルリチン酸二カリウム、アスパルテーム、ステビアなどが挙げられる。

#### 【0057】

前記医薬組成物の剤形としては、例えば錠剤、カプセル剤（ソフトカプセル、マイクロカプセルを含む）、顆粒剤、散剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などの経口剤；及び注射剤（例、皮下注射剤、皮内注射剤、静脈内注射剤、筋肉内注射剤、腹腔内注射剤、関節内注射剤など）、外用剤（例、経鼻投与製剤、経皮製剤、軟膏剤など）、坐剤（例、直腸坐剤、膣坐剤など）、ペレット、点滴剤、徐放性製剤（例、徐放性マイクロカプセルなど）等の非経口剤が挙げられ、これらはそれぞれ経口的あるいは非経口的に安全に投与できる。

医薬組成物は、製剤技術分野において慣用の方法、例えば日本薬局方に記載の方法等により製造することができる。以下に、製剤の具体的な製造法について詳述する。医薬組成物中の本発明の転写調節因子の阻害物質の含量は、剤形、該化合物の投与量などにより異なるが、例えば約0.1ないし100重量%である。

#### 【0058】

例えば、経口剤は、有効成分に、賦形剤（例、乳糖、白糖、デンプン、D-マンニトールなど）、崩壊剤（例、カルボキシメチルセルロースカルシウムなど）、結合剤（例、 $\alpha$ 化デンプン、アラビアゴム、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドンなど）または滑沢剤（例、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコール6000など）などを添加して圧縮成形し、次いで必要により、味のマスキング、腸溶性あるいは持続性を目的として、コーティング基剤を用いて自体公知の方法でコーティングすることにより製造される。

#### 【0059】

該コーティング基剤としては、例えば糖衣基剤、水溶性フィルムコーティング基剤、腸溶性フィルムコーティング基剤、徐放性フィルムコーティング基剤などが挙げられる。

糖衣基剤としては、白糖が用いられ、さらに、タルク、沈降炭酸カルシウム、ゼラチン、アラビアゴム、プルラン、カルナバロウなどから選ばれる1種または

2 種以上を併用してもよい。

水溶性フィルムコーティング基剤としては、例えばヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、メチルヒドロキシエチルセルロースなどのセルロース系高分子；ポリビニルアセタールジエチルアミノアセテート、アミノアルキルメタアクリレートコポリマー E〔オイドラギット E（商品名）、ロームファルマ社〕、ポリビニルピロリドンなどの合成高分子；プルランなどの多糖類などが挙げられる。

腸溶性フィルムコーティング基剤としては、例えばヒドロキシプロピルメチルセルロース フタレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロース アセテートサクシネート、カルボキシメチルエチルセルロース、酢酸フタル酸セルロースなどのセルロース系高分子；メタアクリル酸コポリマー L〔オイドラギット L（商品名）、ロームファルマ社〕、メタアクリル酸コポリマー LD〔オイドラギット L-30D55（商品名）、ロームファルマ社〕、メタアクリル酸コポリマー S〔オイドラギット S（商品名）、ロームファルマ社〕などのアクリル酸系高分子；セラックなどの天然物などが挙げられる。

徐放性フィルムコーティング基剤としては、例えばエチルセルロースなどのセルロース系高分子；アミノアルキルメタアクリレートコポリマー RS〔オイドラギット RS（商品名）、ロームファルマ社〕、アクリル酸エチル・メタアクリル酸メチル共重合体懸濁液〔オイドラギット NE（商品名）、ロームファルマ社〕などのアクリル酸系高分子などが挙げられる。

上記したコーティング基剤は、その 2 種以上を適宜の割合で混合して用いてもよい。また、コーティングの際に、例えば酸化チタン、三二酸化鉄等のような遮光剤を用いてもよい。

#### 【0060】

注射剤は、有効成分を分散剤（例、ポリソルベート 80、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 60、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸ナトリウムなど）、保存剤（例、メチルパラベン、プロピルパラベン、ベンジルアルコール、クロロブタノール、フェノールなど）、等張化剤（例、塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトール、D-ソルビトール、ブドウ糖な

ど)などと共に水性溶剤(例、蒸留水、生理的食塩水、リンゲル液等)あるいは油性溶剤(例、オリーブ油、ゴマ油、綿実油、トウモロコシ油などの植物油、プロピレングリコール等)などに溶解、懸濁あるいは乳化することにより製造される。この際、所望により溶解補助剤(例、サリチル酸ナトリウム、酢酸ナトリウム等)、安定剤(例、ヒト血清アルブミン等)、無痛化剤(例、ベンジルアルコール等)等の添加物を用いてもよい。注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

#### 【0061】

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

#### 【0062】

本発明の抗体を含有する脳・神経細胞保護剤の投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の脳血管障害の治療・予防のために使用する場合には、本発明の抗体を1回量として、通常0.01～20mg/kg体重程度、好ましくは0.1～10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1～5mg/kg体重程度を、1日1～5回程度、好ましくは1日1～3回程度、粉末吸入剤により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

#### 【0063】

MIP-3 $\alpha$ の発現を阻害する物質としては、好ましくは、本発明のMIP-3 $\alpha$ をコードする塩基配列に相補的な塩基配列またはその一部を含有する核酸が挙げられる。本発明のMIP-3 $\alpha$ をコードする塩基配列に相補的な塩基配列またはその一部を含有する核酸(以下、「本発明のアンチセンス核酸」と略記する場合がある)としては、本発明のMIP-3 $\alpha$ と完全に相補的な塩基配列または実質的に相補的な塩基配列、あるいは該相補的な塩基配列の一部を有し、本発明のMIP-3 $\alpha$ をコードするRNAからの該蛋白質の翻訳を抑制する作用を有するものであればよい。「実質的に相補的な塩基配列」としては、本発明のMIP-3 $\alpha$ をコードする塩基配列と、該蛋白質を発現する細胞の生理学的条件下でハ

イブリダイズし得る塩基配列、より具体的には、本発明のMIP-3 $\alpha$ をコードする塩基配列の相補鎖またはその部分塩基配列との間で約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などが挙げられる。

#### 【0064】

本発明のアンチセンス核酸は、クローン化した、あるいは決定された本発明のMIP-3 $\alpha$ をコードする核酸の塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうした核酸は、本発明のMIP-3 $\alpha$ をコードする遺伝子の複製または発現を阻害することができる。即ち、本発明のアンチセンス核酸は、本発明のMIP-3 $\alpha$ をコードする遺伝子から転写されるRNAとハイブリダイズすることができ、mRNAの合成（プロセッシング）または機能（蛋白質への翻訳）を阻害することができる。

#### 【0065】

本発明のアンチセンス核酸の標的領域は、アンチセンス核酸がハイブリダイズすることにより、結果として本発明のMIP-3 $\alpha$ の翻訳が阻害されるものであればその長さに特に制限はなく、本発明のMIP-3 $\alpha$ をコードするRNAの全配列であっても部分配列であってもよく、短いもので約15塩基程度、長いものでmRNAまたは初期転写産物の全配列が挙げられる。合成の容易さや抗原性の問題を考慮すれば、約15～約30塩基からなるオリゴヌクレオチドが好ましいがそれに限定されない。具体的には、例えば、本発明のMIP-3 $\alpha$ をコードする遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、ORF翻訳開始コドン、3'端非翻訳領域、3'端パリンドローム領域、および3'端ヘアピンループが標的領域として選択しうるが、該遺伝子内部の如何なる領域も標的として選択しうる。例えば、該遺伝子のイントロン部分を標的領域とすることもまた好ましい。

さらに、本発明のアンチセンス核酸は、本発明のMIP-3 $\alpha$ をコードするmRNAもしくは初期転写産物とハイブリダイズして蛋白質への翻訳を阻害するだけでなく、二本鎖DNAである本発明のMIP-3 $\alpha$ をコードする遺伝子と結合

して三重鎖（トリプレックス）を形成し、RNAの転写を阻害し得るものであってもよい。

### 【0066】

アンチセンス核酸は、2-デオキシ-D-リボースを含有しているデオキシリボヌクレオチド、D-リボースを含有しているリボヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販の蛋白質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えば蛋白質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリーラーリジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例えば、アクリジン、プソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 $\alpha$ アノマー型の核酸など）であつてもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであつてよい。修飾



されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

#### 【0067】

アンチセンス核酸は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸（RNA、DNA）である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。こうした修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp.247, 1992; Vol. 8, pp.395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

#### 【0068】

アンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リポゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピド、コレステロールなど）といった疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端あるいは5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3'端あるいは5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのヌクレアー

ぜによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

#### 【0069】

本発明のMIP-3 $\alpha$ をコードするmRNAもしくは遺伝子初期転写産物を、コード領域の内部（初期転写産物の場合はイントロン部分を含む）で特異的に切断し得るリボザイムもまた、本発明のアンチセンス核酸に包含され得る。「リボザイム」とは核酸を切断する酵素活性を有するRNAをいうが、最近では当該酵素活性部位の塩基配列を有するオリゴDNAも同様に核酸切断活性を有することが明らかになっているので、本明細書では配列特異的な核酸切断活性を有する限りDNAをも包含する概念として用いるものとする。リボザイムとして最も汎用性の高いものとしては、ウイロイドやウイルソイド等の感染性RNAに見られるセルフスプライシングRNAがあり、ハンマーヘッド型やヘアピン型等が知られている。ハンマーヘッド型は約40塩基程度で酵素活性を発揮し、ハンマーヘッド構造をとる部分に隣接する両端の数塩基ずつ（合わせて約10塩基程度）をmRNAの所望の切断部位と相補的な配列にすることにより、標的mRNAのみを特異的に切断することが可能である。このタイプのリボザイムは、RNAのみを基質とするので、ゲノムDNAを攻撃することがないというさらなる利点を有する。本発明のMIP-3 $\alpha$ をコードするmRNAが自身で二本鎖構造をとる場合には、RNAヘリカーゼと特異的に結合し得るウイルス核酸由来のRNAモチーフを連結したハイブリッドリボザイムを用いることにより、標的配列を一本鎖にすることができる [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98(10): 5572-5577 (2001)]。さらに、リボザイムを、それをコードするDNAを含む発現ベクターの形態で使用する場合には、転写産物の細胞質への移行を促進するために、tRNAを改変した配列をさらに連結したハイブリッドリボザイムとすることもできる [Nucleic Acids Res., 29(13): 2780-2788 (2001)]。

#### 【0070】

本発明のMIP-3 $\alpha$ をコードするmRNAもしくは遺伝子初期転写産物のコ

ード領域内の部分配列（初期転写産物の場合はイントロン部分を含む）に相補的な二本鎖オリゴRNA（small interfering RNA; siRNA）もまた、本発明のアンチセンス核酸に包含され得る。短い二本鎖RNAを細胞内に導入するとそのRNAに相補的なmRNAが分解される、いわゆるRNA干渉（RNAi）と呼ばれる現象は、以前から線虫、昆虫、植物等で知られていたが、最近、この現象が哺乳動物細胞でも起こることが確認されたことから [Nature, 411(6836): 494-498 (2001)]、リボザイムの代替技術として注目されている。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド及びリボザイムは、本発明のMIP-3 $\alpha$ をコードするcDNA配列もしくはゲノミックDNA配列情報に基づいてmRNAもしくは初期転写産物の標的領域を決定し、市販のDNA/RNA自動合成機（アプライド・バイオシステムズ社、ベックマン社等）を用いて、これに相補的な配列を合成することにより調製することができる。siRNAは、センス鎖及びアンチセンス鎖をDNA/RNA自動合成機でそれぞれ合成し、適当なアニーリング緩衝液中で、例えば、約90～約95℃で約1分程度変性させた後、約30～約70℃で約1～約8時間アニーリングさせることにより調製することができる。また、相補的なオリゴヌクレオチド鎖を交互にオーバーラップするように合成して、これらをアニーリングさせた後リガーゼでライゲーションすることにより、より長い二本鎖ポリヌクレオチドを調製することもできる。

#### 【0071】

本発明のアンチセンス核酸を含有する脳・神経細胞保護剤は、上記本発明の抗体の場合と同様に、自体公知の手法で製剤化することができる。

また、例えば、本発明のアンチセンス核酸を単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。該アンチセンス核酸は、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。あるいは、エアロゾル化して吸入剤として気管内に局所投与するこ

ともできる。

さらに、体内動態の改良、半減期の長期化、細胞内取り込み効率の改善を目的に、本発明のアンチセンス核酸を単独またはリポゾームなどの担体とともに製剤（注射剤）化し、静脈、皮下または関節腔内等に投与してもよい。

該アンチセンス核酸の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、急性期脳血管障害の治療の目的で本発明のアンチセンス核酸を投与する場合、一般的に成人（体重 60 kg）においては、一日につき該アンチセンス核酸を約 0.1～100 mg 投与する。

#### 【0072】

さらに、本発明のアンチセンス核酸は、組織や細胞における本発明の MIP-3 $\alpha$  をコードする核酸の存在やその発現状況を調べるための診断用核酸プローブとして使用することもできる。

#### 【0073】

本発明はまた、MIP-3 $\alpha$  とその受容体との結合を阻害する物質、または MIP-3 $\alpha$  の受容体のシグナル情報伝達活性を阻害する物質を含有する脳・神経細胞保護剤を提供する。このような物質としては、例えば、MIP-3 $\alpha$  またはその受容体のアンタゴニストなどが挙げられる。

MIP-3 $\alpha$  の受容体としては、MIP-3 $\alpha$  と特異的に結合してシグナル情報伝達作用を示すものであれば特に制限はないが、例えば、公知の MIP-3 $\alpha$  受容体である CCR6 が挙げられる。「本発明の CCR6」は、配列番号 8 または配列番号 10 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩である。ここで「実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質」とは、上記の本発明の MIP-3 $\alpha$  において詳述したものと同義である。

#### 【0074】

MIP-3 $\alpha$  とその受容体との結合を阻害する物質は、例えば、以下の本発明の MIP-3 $\alpha$  もしくはその部分ペプチドまたはその塩、および／または MIP-3 $\alpha$  受容体（例えば、本発明の CCR6）もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いたスクリーニング方法によって得ることができる。

## 【0075】

[脳・神経細胞保護作用を有する物質のスクリーニング]

本発明は、本発明のMIP-3 $\alpha$ もしくはその部分ペプチドまたはその塩（以下、本スクリーニングの説明において、これらを包括して単に「本発明のMIP-3 $\alpha$ 」と略記する場合がある）および／またはMIP-3 $\alpha$ 受容体（例えば、本発明のCCR6）もしくはその部分ペプチドまたはその塩（以下、本スクリーニングの説明において、これらを包括して単に「本発明のCCR6」と略記する場合がある）を用いることを特徴とする、本発明のMIP-3 $\alpha$ の活性（例えば、シグナル情報伝達活性、受容体結合活性など）を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

より具体的には、例えば、(i) 試験化合物の存在下および非存在下で本発明のMIP-3 $\alpha$ と本発明のCCR6との結合活性を測定・比較する、(ii) 本発明のMIP-3 $\alpha$ の存在下と本発明のMIP-3 $\alpha$ および試験化合物の存在下とで、本発明のCCR6を産生する能力を有する細胞におけるシグナル情報伝達活性を測定・比較することを特徴する、本発明のMIP-3 $\alpha$ の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法が用いられる。

上記スクリーニング方法においては、例えば (i) と (ii) の場合において、シグナル情報伝達活性および受容体結合活性を自体公知の方法により測定する。

具体的には、試験化合物の存在下および非存在下において、例えば、CCR6発現細胞 [本発明のCCR6をコードするDNA、例えば、配列番号：7または9で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：13に示される塩基配列中塩基番号343～1440で表される塩基配列を含有するDNA、あるいは配列番号：7または9で表される塩基配列を含有するDNAまたは配列番号：13に示される塩基配列中塩基番号343～1440で表される塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができるDNAであって、配列番号：8または10、あるいは配列番号：14で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNA（ここで「ハイストリンジェントな条件」、「実質的に同質な活性」等は上記と同義である）を、本発明のMIP-3 $\alpha$ の説明において例示し

たと同様の発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを本発明のMIP-3 $\alpha$ の説明において例示したと同様の宿主細胞（例、CHO-K1細胞など）に、同様の形質転換法を用いて導入して得られた形質転換細胞]を、本発明のMIP-3 $\alpha$ の存在下で培養し、細胞膜上に発現したCCR6を介するシグナル情報伝達活性（例えば、細胞内cAMP濃度の上昇または低下、細胞内Ca<sup>2+</sup>の遊離、イノシトールリン酸の産生、細胞膜電位の変動、細胞内蛋白質のリン酸化または脱リン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性）を、公知の方法により測定する。

あるいは、試験化合物の存在下および非存在下において、（１）標識した本発明のMIP-3 $\alpha$ を本発明のCCR6に接触させ、標識したMIP-3 $\alpha$ の該受容体に対する結合量を測定して比較する、（２）標識した本発明のMIP-3 $\alpha$ を本発明のCCR6を含有する細胞（例えば、CCR6を発現することが知られているリンパ球などの免疫細胞、樹状細胞、アストロサイトなど）または該細胞の膜画分に接触させ、標識したMIP-3 $\alpha$ の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定して比較する、（３）標識した本発明のMIP-3 $\alpha$ を、CCR6をコードするDNAを含有する形質転換体（例えば、上記の形質転換細胞など）を培養することによって細胞膜上に発現した該タンパク質に接触させ、標識したMIP-3 $\alpha$ の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定して比較する。

#### 【0076】

本発明のMIP-3 $\alpha$ は単離されたタンパク質として本発明のCCR6またはそれを産生する能力を有する細胞を含む系に外部から添加してもよいし、あるいは、前述した本発明のMIP-3 $\alpha$ をコードするDNAを含有するベクターで形質転換された宿主（形質転換体）を用いてもよい。宿主としては、例えば、マウスATDC5細胞、CHO細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本発明のMIP-3 $\alpha$ を細胞外に分泌する形質転換体が好ましく用いられる。本発明のMIP-3 $\alpha$ を発現し得る細胞の培養方法は、前記した本発明の形質変換体の培養法と同様である。

試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合

成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などがあげられる。

例えば、試験化合物の存在下におけるシグナル情報伝達活性または受容体結合活性が、試験化合物の非存在下に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上減少させた場合、その試験化合物を本発明のMIP-3 $\alpha$ の活性を阻害する化合物として選択することができる。

#### 【0077】

MIP-3 $\alpha$ の受容体アンタゴニストは、該受容体、好ましくは本発明のCCR6と、該受容体の他のリガンド、例えば、上記スクリーニング法においてCCR6アゴニストとして選択された化合物（例、合成低分子化合物）とを用いて同様にスクリーニングすることができる。

また、MIP-3 $\alpha$ 受容体のインバースアゴニストもまた、本発明の脳・神経細胞保護作用を有する物質として好ましいが、かかる物質は、上記のいずれかのスクリーニング法他、本発明のCCR6を単独で上記の(i)または(ii)の方法に適用することによってもスクリーニングすることができる。

#### 【0078】

上記本発明のスクリーニング方法に用いられるキットは、本発明のMIP-3 $\alpha$ および／または本発明のCCR6を含有するものである。シグナル情報伝達活性を指標としてスクリーニングを行う場合、本発明のCCR6は、それを産生する能力を有する細胞として提供される。本発明のMIP-3 $\alpha$ は単離されたタンパク質として提供されてもよいし、それを産生する能力を有する細胞として提供されてもよい。また、受容体結合活性を指標とする場合は、本発明のMIP-3 $\alpha$ は標識されていることが好ましい。

#### 【0079】

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物またはその塩であり、本発明のMIP-3 $\alpha$ の受容体結合活性および／またはシグナル情報伝達活性を阻害する化合物ま

たはその塩である。該化合物の塩としては、前記した本発明のMIP-3 $\alpha$ の塩と同様のものが用いられる。

#### 【0080】

本発明のMIP-3 $\alpha$ の受容体結合活性および／またはシグナル情報伝達活性を阻害する化合物またはその塩を含有する脳・神経細胞保護剤は、上記本発明の抗体の場合と同様にして製剤化することができる。

該脳・神経細胞保護剤の投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の脳血管障害の治療・予防のために使用する場合には、本発明のMIP-3 $\alpha$ の受容体結合活性および／またはシグナル情報伝達活性を阻害する化合物またはその塩を、1回量として、通常0.01～20mg/kg体重程度、好ましくは0.1～10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1～5mg/kg体重程度、1日1～5回程度、好ましくは1日1～3回程度、粉末吸入剤により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

#### 【0081】

本発明のMIP-3 $\alpha$ をコードする遺伝子は、脳虚血において発現が増加するので、本発明のMIP-3をコードする遺伝子の発現を阻害する物質も、脳・神経細胞保護作用を有する物質として使用することができる。

したがって、本発明のMIP-3 $\alpha$ をコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸は、本発明のMIP-3 $\alpha$ をコードする遺伝子の発現を阻害する物質のスクリーニングのための試薬として有用である。

#### 【0082】

すなわち、本発明はまた、本発明のMIP-3 $\alpha$ をコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸を用いることを特徴とする、脳・神経細胞保護作用を有する物質のスクリーニング法を提供する。

該スクリーニング方法としては、試験化合物の存在下および非存在下で本発明のMIP-3を産生する能力を有する細胞を培養し、両条件下でのMIP-3 $\alpha$ のmRNA量を測定・比較する。



試験化合物および本発明のMIP-3 $\alpha$ を産生する能力を有する細胞としては、上記と同様のものが挙げられる。

mRNA量の測定は、公知の方法、例えば、プローブとして本発明のMIP-3 $\alpha$ をコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸を用いるノーザンハイブリダイゼーション、あるいはプライマーとして本発明のMIP-3 $\alpha$ をコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸を用いるPCR法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。

例えば、試験化合物非存在下における遺伝子発現量を、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害させる試験化合物を、本発明のMIP-3 $\alpha$ をコードする遺伝子の発現を阻害する化合物、したがって、脳・神経細胞保護作用を有する化合物として選択することができる。

#### 【0083】

本発明のMIP-3 $\alpha$ をコードする遺伝子の発現量は、本発明のMIP-3 $\alpha$ に対する抗体を用いても測定することができる。

即ち、前記本発明のMIP-3 $\alpha$ を産生する能力を有する細胞を試験化合物の存在下および非存在下で培養した後、細胞上清または細胞抽出液中に存在するMIP-3 $\alpha$ タンパク質量を、本発明のMIP-3 $\alpha$ に対する抗体を用いて、公知の方法、例えば、ウェスタン解析、ELISA法などの方法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。

例えば、試験化合物非存在下におけるタンパク質産生量を、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害させる試験化合物を、本発明のMIP-3 $\alpha$ をコードする遺伝子の発現を阻害する化合物、したがって、脳・神経細胞保護作用を有する化合物として選択することができる。

#### 【0084】

MIP-3 $\alpha$ は、その受容体（例えば、CCR6）と結合して該受容体発現細胞にシグナル情報を伝達することにより生理活性を発揮していることから、受け皿となる受容体の発現が阻害されれば活性が低下する。したがって、該受容体の発現を阻害する物質もまた、本発明におけるMIP-3 $\alpha$ 抑制薬である。

したがって、本発明はまた、本発明のCCR6をコードする塩基配列またはそ

の一部を含有する核酸、あるいは本発明のCCR6もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を用いることを特徴とする、脳・神経細胞保護作用を有する物質のスクリーニング法を提供する。

該スクリーニング方法としては、試験化合物の存在下および非存在下で本発明のCCR6を産生する能力を有する細胞を培養し、両条件下でのCCR6のmRNA量またはタンパク質量を測定・比較する方法が挙げられる。

mRNA量の測定は、公知の方法、例えば、プローブとして本発明のCCR6をコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸を用いるノーザンハイブリダイゼーション、あるいはプライマーとして本発明のCCR6をコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸を用いるPCR法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。

タンパク質量の測定は、本発明のCCR6を産生する能力を有する細胞を試験化合物の存在下および非存在下で培養した後、細胞膜画分または細胞抽出液を単離し、本発明のCCR6に対する抗体を用いて、公知の方法、例えば、ウェスタン解析、ELISA法などの方法またはそれに準じる方法に従い行うことができる。CCR6に対する抗体は、上記MIP-3 $\alpha$ に対する抗体と同様の手法を用いて作製することができる。

#### 【0085】

上記本発明のスクリーニング方法に用いられるキットは、本発明のMIP-3 $\alpha$ をコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸または本発明のMIP-3 $\alpha$ に対する抗体、本発明のMIP-3 $\alpha$ を産生する能力を有する細胞等、あるいは本発明のCCR6をコードする塩基配列またはその一部を含有する核酸または本発明のCCR6に対する抗体、本発明のCCR6を産生する能力を有する細胞等を含有するものである。

#### 【0086】

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物またはその塩であり、本発明のMIP-

3 $\alpha$ または本発明のCCR6の発現を阻害する化合物またはその塩である。該化合物の塩としては、前記した本発明のMIP-3 $\alpha$ の塩と同様のものが用いられる。

#### 【0087】

上記の本発明のMIP-3 $\alpha$ または本発明のCCR6の発現を阻害する化合物またはその塩を含有する脳・神経細胞保護剤は、上記本発明の抗体の場合と同様にして製剤化することができる。

該脳・神経細胞保護剤の投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の脳血管障害の治療・予防のために使用する場合には、本発明のMIP-3 $\alpha$ または本発明のCCR6の発現を阻害する化合物またはその塩を、1回量として、通常0.01~20mg/kg体重程度、好ましくは0.1~10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1~5mg/kg体重程度、1日1~5回程度、好ましくは1日1~3回程度、粉末吸入剤により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

#### 【0088】

[本発明のMIP-3 $\alpha$ もしくはその部分ペプチドまたはその塩の定量]

本発明のMIP-3 $\alpha$ に対する抗体は、本発明のMIP-3 $\alpha$ を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のMIP-3 $\alpha$ の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

(i) 本発明のMIP-3 $\alpha$ に対する抗体と、被検液および標識化された本発明のMIP-3 $\alpha$ とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のMIP-3 $\alpha$ の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のMIP-3 $\alpha$ の定量法、および

(ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明のMIP-3 $\alpha$ に対する抗体および標識化された別の本発明のMIP-3 $\alpha$ に対する抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液

中の本発明のMIP-3 $\alpha$ の定量法を提供する。

上記(ii)の定量法においては、一方の抗体が本発明のMIP-3 $\alpha$ のN端部を認識する抗体であれば、他方の抗体は本発明のMIP-3 $\alpha$ の他の部分、例えば、を認識する抗体であることが望ましい。

#### 【0089】

また、本発明のMIP-3 $\alpha$ に対するモノクローナル抗体を用いて本発明のMIP-3 $\alpha$ の定量を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(a b')<sub>2</sub>、F a b'、あるいはF a b画分を用いてもよい。

本発明のMIP-3 $\alpha$ に対する抗体を用いる本発明のMIP-3 $\alpha$ の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、タンパク質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、[<sup>125</sup>I]、[<sup>131</sup>I]、[<sup>3</sup>H]、[<sup>14</sup>C]などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

#### 【0090】

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常タ

ンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。

サンドイッチ法においては、不溶化した本発明のMIP-3 $\alpha$ に対するモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した別の本発明のMIP-3 $\alpha$ に対するモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のMIP-3 $\alpha$ 量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明のMIP-3 $\alpha$ の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のMIP-3 $\alpha$ に対するモノクローナル抗体は、本発明のタンパク質の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のMIP-3 $\alpha$ のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

#### 【0091】

本発明のMIP-3 $\alpha$ に対するモノクローナル抗体を、サンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることもできる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原(F)と、抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコ

ール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

#### 【0092】

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のタンパク質の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))(以上、アカデ

ミックプレス社発行)などを参照することができる。

以上のようにして、本発明のMIP-3 $\alpha$ に対する抗体を用いることによって、本発明のMIP-3 $\alpha$ を感度良く定量することができる。

さらには、本発明のMIP-3 $\alpha$ に対する抗体を用いて本発明のMIP-3 $\alpha$ の濃度を定量することによって、本発明のMIP-3 $\alpha$ の濃度の増加または減少が検出された場合、脳・神経細胞傷害、例えば脳梗塞、脳出血、くも膜下出血などの脳血管障害または頭部外傷などにおける脳・神経細胞傷害を受けているか、または将来細胞傷害を受ける可能性が高いと診断することができる。

また、本発明のMIP-3 $\alpha$ に対する抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のMIP-3 $\alpha$ を検出するために使用することができる。また、本発明のMIP-3 $\alpha$ を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のMIP-3 $\alpha$ の検出、被検細胞内における本発明のMIP-3 $\alpha$ の挙動の分析などのために使用することができる。

### 【0093】

#### [遺伝子診断薬]

本発明のMIP-3 $\alpha$ をコードするDNA（以下、本項（遺伝子診断薬）および次項のDNA転移動物・ノックアウト動物の説明において、単に「本発明のDNA」と略記する場合がある）は、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは他の温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）における本発明のMIP-3 $\alpha$ またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断薬として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミックス (Genomics) , 第5巻, 874~879頁 (1989年)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ユーエスエー (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) , 第

86巻, 2766~2770頁(1989年)) などにより実施することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現過多が検出された場合や PCR-SSCP法によりDNAの突然変異が検出された場合は、脳・神経細胞傷害、例えば脳梗塞、脳出血、くも膜下出血などの脳血管障害または頭部外傷などによる脳・神経細胞傷害を受けているか、または将来細胞傷害を受ける可能性が高いと診断することができる。

#### 【0094】

##### [DNA転移動物]

本発明は、外来性の本発明のMIP-3 $\alpha$ をコードするDNA(以下、本発明の外来性DNAと略記する)またはその変異DNA(本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある)を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (1) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、
- (2) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(1)記載の動物、
- (3) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第(2)記載の動物、および
- (4) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。

本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物(以下、本発明のDNA転移動物と略記する)は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階(さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前)に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作成することもできる。



非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F<sub>1</sub>系統、BDF<sub>1</sub>系統、B6D2F<sub>1</sub>系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例えば、Wistar, SDなど）などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

#### 【0095】

本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

該異常DNAとしては、異常な本発明のMIP-3 $\alpha$ を発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のMIP-3 $\alpha$ の機能を抑制するタンパク質を発現させるDNAなどが用いられる。

本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

#### 【0096】

本発明のMIP-3 $\alpha$ の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、 $\lambda$ ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、①ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど）に由来するDNAのプロモーター、②各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンII、ウロプラキンII、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 $\beta$ 、ケラチンK1, K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼ $\beta$ Iサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にTie2と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素（Na, K-ATPase）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロテインナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原（H-2L）、H-ras、レニン、ドーパミン $\beta$ -水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）、ペプチド鎖延長因子1 $\alpha$ （EF-1 $\alpha$ ）、 $\beta$ アクチン、 $\alpha$ および $\beta$ ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部（VNP）、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋 $\alpha$ アクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトペプチド鎖延長因子1 $\alpha$ （EF-1 $\alpha$ ）のプロモーター、ヒトおよびニワトリ $\beta$ アクチンプロモーターなどが好適である。

上記ベクターは、DNA転移哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列（一般にターミネーターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネーターなどが用いられる。

#### 【0097】

その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

正常な本発明のMIP-3 $\alpha$ の翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常なタンパク質の翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環

境で継代飼育することが出来る。

受精卵細胞段階における本発明の外來性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外來性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外來性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外來性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外來性DNAを過剰に有する。

導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

#### 【0098】

本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明のMIP-3 $\alpha$ の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明のMIP-3 $\alpha$ の機能亢進症や、本発明のMIP-3 $\alpha$ が関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、本発明の外來性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のMIP-3 $\alpha$ の増加症状を有することから、本発明のMIP-3 $\alpha$ に関連する疾患に対する予防・治療剤、例えば脳梗塞、脳出血、くも膜下出血などの脳血管障害、また頭部外傷、さらには様々な炎症性疾患などの予防・治療剤のスクリーニング試験にも利用可能である。

一方、本発明の外來性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外來性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外來DNAを前述のプラスミドに組み込んで原科として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および

体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

### 【0099】

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のMIP-3 $\alpha$ の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明のMIP-3 $\alpha$ の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のMIP-3 $\alpha$ の機能不活性型不応症における本発明の異常タンパク質による正常タンパク質の機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。

また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のMIP-3 $\alpha$ の増加症状を有することから、本発明のMIP-3 $\alpha$ または機能不活性型不応症に対する予防・治療剤、例えば、脳梗塞、脳出血、くも膜下出血などの脳血管障害、また頭部外傷、さらには様々な炎症性疾患などの予防・治療剤のスクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記2種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

- ①組織培養のための細胞源としての使用、
- ②本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたペプチド組織を分析することによる、本発明のMIP-3 $\alpha$ により特異的に発現あるいは活性化するペプチドとの関連性について

の解析、

③DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、

④上記③記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および

⑤本発明の変異タンパク質を単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

#### 【0100】

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のMIP-3 $\alpha$ の機能不活性化型不応症などを含む、本発明のMIP-3 $\alpha$ に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のMIP-3 $\alpha$ に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のMIP-3 $\alpha$ 産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明のMIP-3 $\alpha$ およびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のMIP-3 $\alpha$ の機能不活性化型不応症を含む、本発明のMIP-3 $\alpha$ に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のMIP-3 $\alpha$ が関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

#### 【0101】

##### [ノックアウト動物]

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (1) 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
- (2) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第（1）項記載の胚幹細胞、
- (3) ネオマイシン耐性である第（1）項記載の胚幹細胞、
- (4) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第（1）項記載の胚幹細胞、
- (5) ゲッ歯動物がマウスである第（4）項記載の胚幹細胞、
- (6) 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、
- (7) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第（6）項記載の非ヒト哺乳動物、
- (8) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第（6）項記載の非ヒト哺乳動物、
- (9) ゲッ歯動物がマウスである第（8）項記載の非ヒト哺乳動物、および
- (10) 第（7）項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

#### 【0102】

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のMIP-3 $\alpha$ の活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のMIP-3 $\alpha$ の発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記する）をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

## 【0103】

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエクソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（ $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエクソンの機能を破壊するか、あるいはエクソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、polyA付加シグナルなど）を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知 EvansとKaufmaの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF<sub>1</sub>マウス（C57BL/6とDBA/2とのF<sub>1</sub>）を用いて樹立したものなども良好に用いる。BDF<sub>1</sub>マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロス



することでその遺伝的背景を C57BL/6 マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後 3.5 日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に 8 細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれの ES細胞を用いてもよいが、通常雄の ES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

#### 【0104】

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法により Y 染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その 1 例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約  $10^6$  個の細胞数を要していたのに対して、1 コロニー程度の ES細胞数（約 50 個）で済むので、培養初期における ES細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

また、第二次セレクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られる ES細胞の染色体数は正常数の 100% が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞（例えば、マウスでは染色体数が  $2n = 40$  である細胞）に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO 繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上で LIF（ $1-1000$  U/ml）存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5% 炭酸ガス、95% 空気または 5% 酸素、5% 炭酸ガス、90% 空気）で約  $37^{\circ}\text{C}$  で培養する方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA 溶液（通常  $0.001-0.5\%$  トリプシン/ $0.1-5$  mM EDTA、好ましくは約  $0.1\%$  トリプシン/ $1$  mM EDTA）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に

播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1-3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり〔M. J. Evans及びM. H. Kaufman, ネイチャー (Nature) 第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 第78巻、7634頁、1981年; T. C. Doetschmanら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年〕、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のMIP-3 $\alpha$ の細胞生物学的検討において有用である。

#### 【0105】

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。

本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた

場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のMIP-3 $\alpha$ のヘテロ発現不全個体であり、本発明のMIP-3 $\alpha$ のヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のMIP-3 $\alpha$ のホモ発現不全個体を得ることができる。

#### 【0106】

卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1，ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA

発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のMIP-3 $\alpha$ により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のMIP-3 $\alpha$ の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

#### 【0107】

(a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

#### 【0108】

例えば、脳梗塞、脳出血、くも膜下出血などの脳血管障害、また頭部外傷、さらには様々な炎症性疾患などに対して治療・予防効果を有する化合物をスクリーニングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の行動や梗塞体積などを経時的に観察し、上記疾患の症状を観察する。

該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試験動物の上記疾患症状が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上改善した場合、該試験化合物を上記の疾患に対して治療・予防効果を有する化合物として選択することができる。

該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のMIP-3 $\alpha$ の欠損や損傷などによって引き起こされる疾患に対して治療・予防効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のMIP-3 $\alpha$ を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の脳血管障害患者においては、一日につき該化合物を約0.1～

100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、該化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）の脳血管障害の患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

### 【0109】

(b) 本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニング方法

本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明のMIP-3 $\alpha$ をコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）で置換している場合、本来、本発明の

MIP-3 $\alpha$ の発現する組織で、本発明のMIP-3 $\alpha$ の代わりに $\beta$ -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -ガラクトピラノシド (X-gal) のような $\beta$ -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のMIP-3 $\alpha$ の動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のMIP-3 $\alpha$ 欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZをコードするmRNAを検出してもよい。

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸 (例、無機酸など) や塩基 (例、有機酸など) などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸 (例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など) との塩、あるいは有機酸 (例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など) との塩などが用いられる。

#### 【0110】

本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩は、本発明のMIP-3 $\alpha$ の発現の調節、該タンパク質の機能を調節することができるので、例えば、脳梗塞、脳出血、くも膜下出血などの脳血管障害、また頭部外傷、さらには様々な炎症性疾患などの予防・治療剤として有用である。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のMIP-3 $\alpha$ またはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の脳卒中患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）の脳卒中患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療剤の開発に大きく貢献することができる。

また、本発明のMIP-3 $\alpha$ のプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパクをコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、特異的にそのタンパク質を合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のMIP-3 $\alpha$ そのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。



## 【0111】

本明細書において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
ATP	: アデノシン三リン酸
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
Gly	: グリシン
Ala	: アラニン
Val	: バリン
Leu	: ロイシン
Ile	: イソロイシン
Ser	: セリン
Thr	: スレオニン
Cys	: システイン
Met	: メチオニン

G l u	: グルタミン酸
A s p	: アスパラギン酸
L y s	: リジン
A r g	: アルギニン
H i s	: ヒスチジン
P h e	: フェニルアラニン
T y r	: チロシン
T r p	: トリプトファン
P r o	: プロリン
A s n	: アスパラギン
G l n	: グルタミン
p G l u	: ピログルタミン酸
S e c	: セレノシステイン (selenocysteine)

## 【0112】

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

M e	: メチル基
E t	: エチル基
B u	: ブチル基
P h	: フェニル基
T C	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基
T o s	: p-トルエンスルフォニル
C H O	: ホルミル
B z l	: ベンジル
Cl <sub>2</sub> -Bzl	: 2, 6-ジクロロベンジル
B o m	: ベンジルオキシメチル
Z	: ベンジルオキシカルボニル
C l - Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
B r - Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル

B o c	: t-ブトキシカルボニル
D N P	: ジニトロフェニル
T r t	: トリチル
B u m	: t-ブトキシメチル
F m o c	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
H O B t	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
H O O B t	: 3,4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ- 1,2,3-ベンゾトリアジン
H O N B	: 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド
D C C	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

## 【0113】

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

## 〔配列番号：1〕

ヒトMIP-3 $\alpha$ のcDNAの塩基配列を示す。

## 〔配列番号：2〕

ヒトMIP-3 $\alpha$ の前駆ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

## 〔配列番号：3〕

ラットMIP-3 $\alpha$ のcDNAの塩基配列を示す。

## 〔配列番号：4〕

ラットMIP-3 $\alpha$ の前駆ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

## 〔配列番号：5〕

マウスMIP-3 $\alpha$ のcDNAの塩基配列を示す。

## 〔配列番号：6〕

マウスMIP-3 $\alpha$ の前駆ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

## 〔配列番号：7〕

ヒトCCR6のcDNAの塩基配列を示す。

## 〔配列番号：8〕

ヒトCCR6のアミノ酸配列を示す。

## 〔配列番号：9〕

マウスCCR6のcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：10〕

マウスCCR6のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：11〕

ラットMIP-3 $\alpha$ 遺伝子転写産物の断片を増幅するためのプライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

〔配列番号：12〕

ラットMIP-3 $\alpha$ 遺伝子転写産物の断片を増幅するためのプライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

〔配列番号：13〕

ラット腎臓由来CCR6 cDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：14〕

ラットCCR6のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：15〕

ラット肝臓由来CCR6 cDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：16〕

ラット腎臓由来CCR6 cDNAを増幅するためのプライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

〔配列番号：17〕

ラット腎臓またはラット肝臓由来CCR6 cDNAを増幅するためのプライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

〔配列番号：18〕

ラット肝臓由来CCR6 cDNAを増幅するためのプライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

〔配列番号：19〕

ラットCCR6遺伝子産物の断片を増幅するためのプライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

〔配列番号：20〕

ラットCCR6遺伝子産物の断片を増幅するためのプライマーとして機能すべ

く設計されたオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

〔配列番号：21〕

ラットCCR6遺伝子産物の断片を増幅するためのプライマーとして機能すべく設計されたオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

【0114】

【実施例】

以下において、実施例により本発明をより具体的にするが、この発明はこれらに限定されるものではない。

【0115】

実施例1 ラット脳虚血モデルにおけるMIP-3 $\alpha$ 遺伝子の発現増加と低体温処置による発現減少

ラット局所脳虚血モデルでの脳組織におけるMIP-3 $\alpha$ 遺伝子の発現増加と低体温処置による発現減少の有無を調べた。脳虚血モデルとしては、8週齢SD系雄性ラット(日本チャールズ・リバー社)を用いて中大脳動脈閉塞モデルを作成した(清田ら、エクスペリメンタル・ブレイン・リサーチ(Experimental Brain Research)、95巻、388-396頁、1993年)。すなわち、ハロセン麻酔下でシリコンコーティングした栓子を右側総頸動脈より中大脳動脈基始部まで挿入し、120分間閉塞した。その後、栓子除去による再灌流開始から0、2、4、6、8、24、48、96時間後に、一群あたり5匹のラットを屠殺・全脳を摘出、梗塞中心部および辺縁部を分取した後、各群ごとに1サンプルとしてまとめた。低体温処置群も同様に局所脳虚血に供した後、再灌流開始と同時に低温処置(ケージ内を冷風で冷やすことにより脳温が35度を保つように維持)を開始し、虚血群と同様に2、4、6、8、24、48、96時間後に全脳を摘出、各群ごとに1サンプルとしてまとめた。上記の各脳組織サンプルを液体窒素下で粉碎した後、粉碎湿組織よりアイソジェン(ニッポンジーン社)を用いて添付書記載の方法に従ってトータルRNAを精製した。メッセージクリーンキット(ジーン・ハンター社)を用いて混入したゲノムDNAを除去した後、サーモクリプトRT-PCRキット(GIBCO BRL社)を用いて1本鎖cDNAを合成した。得られたcDNAを基に、MIP-3 $\alpha$ 遺伝子の定量的PCRによる発現量

解析を行った。すなわちプライマー・エクスプレス（アプライド・バイオシステムズ社）を用いてMIP-3 $\alpha$ 遺伝子の定量的PCRプライマーセットを設計し、選択した2種類のオリゴヌクレオチド（配列番号11：5'-AGAAATGGCCTGCAAGCATCT-3'；配列番号12：5'-TGCAGAGGTAAGCCAGCAGTA-3'）を合成（プロリゴ・ジャパン社に委託）した。上記のプライマーセットを用いて増幅したMIP-3 $\alpha$ 遺伝子断片は定量的ための基準配列とした。定量的PCRの反応系には、上記プライマーセットおよびPCRクエンティテック・サイバーグリーンPCRマスターキット（キアジェン社）を使用した。一反応あたりポリA+RNA 0.8 ngに由来する前述ラットcDNA、または0から10<sup>6</sup>コピーの標準MIP-3 $\alpha$ 遺伝子を鋳型として用い、ABIプリズム7000（アプライド・バイオシステムズ社）を用いて解析を行なった。MIP-3 $\alpha$ 遺伝子発現量は、標準MIP-3 $\alpha$ 遺伝子からの算出した検量線から、各サンプル内のMIP-3 $\alpha$ cDNAコピー数を算出することによって求めた。各サンプル間の値を補正するために、タックマンローデントGAPDH・コントロールリジェントVICプローブ（アプライド・バイオシステムズ社）を用いて算出した同サンプル内のGAPDHコピー数をコントロールとし、鋳型cDNA中のGAPDH1コピーあたりのMIP-3 $\alpha$ 遺伝子コピー数として算出した。その結果、図1に示すように、梗塞中心部、辺縁部両部位とも、再灌流開始2時間後からMIP-3 $\alpha$ 遺伝子の発現量が増加することが示された。梗塞中心部では再灌流開始から24時間後に、辺縁部では8時間後にMIP-3 $\alpha$ 遺伝子発現量は最大に達し、以後発現量は減少した。またこれらの発現は梗塞中心部、辺縁部いずれにおいても、低体温処置により抑制されることが判明した。以上の結果から、MIP-3 $\alpha$ が虚血後の再灌流に伴い著しく発現誘導され、かつ低体温処置により顕著に抑制される遺伝子であることが示された。

#### 【0116】

実施例2 抗MIP-3 $\alpha$ 抗体によるラット脳虚血モデルにおける脳保護効果

ラット局所脳虚血モデルの脳梗塞容積に対する、中和活性を有する抗ラットMIP-3 $\alpha$ モノクローナル抗体（以下、抗MIP-3 $\alpha$ 抗体と表記する）の脳室内投与による抑制作用を調べた。脳虚血モデルとしては、8週齢SD系雄性ラッ

ト(日本チャールズリバー社)を用いて中大脳動脈閉塞モデルを作成した(清田ら、エクスperimental・ブレイン・リサーチ(Experimental Brain Research)、95巻、388-396頁、1993年)。すなわち、ハロセン麻酔下にシリコンコーティングをした栓子を右側総頸動脈より中大脳動脈起始部まで挿入し120分間の閉塞をした。実験1では、中大脳動脈閉塞直前にハロセン麻酔下にラットを脳定位固定装置に取り付け、虚血側側脳室(A P:-0.8、M L:-1.6、D V:-4.0、但し硬膜から)に、抗M I P-3  $\alpha$ 抗体(I g G 1:ゲンザイム・テクノ社、カタログ番号:43540;20  $\mu$ g/10  $\mu$ l)、またはコントロール抗体(I g G 1:ゲンザイム・テクノ社、カタログ番号:43002;20  $\mu$ g/10  $\mu$ l)を注入した。虚血処置1日後にラット脳を摘出し、厚さ2mmの前額断スライスを作製、TTC染色像から画像解析により脳梗塞容積を測定したところ、抗M I P-3  $\alpha$ 抗体投与群の梗塞容積は対照群と比較して有意に( $P<0.05$ )小さかった(図2A)。実験2として、中大脳動脈閉塞再灌流直後に上記と同様の方法でコントロール抗体または抗M I P-3  $\alpha$ 抗体を脳室内に注入し、2日後の脳梗塞容積を測定したところ、抗M I P-3  $\alpha$ 抗体投与群で有意に( $P<0.05$ )脳梗塞容積が小さかった(図2B)。以上の結果はM I P-3  $\alpha$ の機能を抑制することにより、脳梗塞抑制作用があることを示す。

#### 【0117】

実施例3 ラット脳虚血モデルにおけるM I P-3  $\alpha$ タンパク質の産生増加と低体温処置による産生減少

ラット局所脳虚血モデルでの脳組織におけるM I P-3  $\alpha$ タンパク質の産生増加と低体温処置による産生減少の有無を調べた。脳虚血モデルとしては、8週齢SD系雄性ラット(日本チャールズ・リバー社)を用いて中大脳動脈閉塞モデルを作成した(清田ら、エクスperimental・ブレイン・リサーチ(Experimental Brain Research)、95巻、388-396頁、1993年)。すなわち、ハロセン麻酔下で、シリコンコーティングした栓子を右側総頸動脈より中大脳動脈起始部まで挿入し、120分間閉塞した。その後、栓子除去による再灌流開始から0、4、8、24、48、96時間後に、一群あたり5匹のラットを屠殺・全脳を摘出、梗塞中心部および辺縁部を分取した後、各群ごとに1サンプルとしてま

とめた。低体温処置群も同様に局所脳虚血した後、再灌流開始と同時に低温処置（ケージ内を冷風で冷やすことにより脳温が35℃を保つように維持）を開始し、虚血群と同様に4、8、24、48、96時間後に全脳を摘出、各群ごとに1サンプルとしてまとめた。上記の各脳組織サンプルを液体窒素下で粉碎した後、セルリテック-MT・ママリアン・ティッシュ・リシス/イクストラクション・リージェント（CellLytic-MT Mammalian Tissue Lysis/Extraction Reagent；シグマ社）にプロテアーゼインヒビター・カクテル（P8340；シグマ社）を100分の1量添加した溶解液を、脳粉碎組織各50mgに対して1mlずつ添加し、ポリトロンにより可溶化した。その後、各可溶化組織液を4℃で5分間、12,000回転で遠心し、不溶画分を除去した上清液をサンプル液とした。このサンプル液を下記に述べるラットMIP-3 $\alpha$ サンドイッチELISAに供し、脳組織タンパク質1mgあたりのMIP-3 $\alpha$ タンパク質量として図3に表した。サンプル液中のタンパク質量はBCAプロテイン・アッセイ・キット（ピアース社）を用いて添付のマニュアルに従って定量した。尚、ラットMIP-3 $\alpha$ サンドイッチELISAは市販の抗ラットMIP-3 $\alpha$ 抗体（43540；ジェンザイム・テクネ社）、およびビオチン標識抗ラットMIP-3 $\alpha$ ポリクローナル抗体（44540；ジェンザイム・テクネ社）を用いて実施した。すなわち、抗ラットMIP-3 $\alpha$ 抗体（43540）をリン酸緩衝液（PBS）で2 $\mu$ g/mlの濃度になるように希釈し、これを96穴ELISAプレートに100 $\mu$ lずつ分注した。室温で2時間放置の後、洗浄緩衝液（0.05% Tween 20を含有したPBS、pH 7.2）にて3回洗浄したプレートにブロック緩衝液（1%牛胎児血清、5% シュークロース、0.05% アジ化ナトリウムを含有したPBS）を各ウェルあたり300 $\mu$ l添加し、室温で1時間放置した。その後、洗浄緩衝液で3回洗浄し、各希釈サンプル液およびラットMIP-3 $\alpha$ スタンダード液を100 $\mu$ lずつ添加、2時間室温で放置した。3回洗浄緩衝液で洗浄した後、PBSで50ng/mlに希釈したビオチン標識抗ラットMIP-3 $\alpha$ ポリクローナル抗体（44540）を100 $\mu$ lずつ添加し、室温にて2時間放置した。洗浄した後は、プロテイン・ディテクターELISAキット（protein detector ELISA kit；KPL社）に添付のマニュアルに従って、ストレプトアビジン-ホースラディッシュ・パ



ーオキシダーゼをビオチン標識抗ラットMIP-3  $\alpha$  ポリクローナル抗体に結合させた後、反応基質を各ウェルに添加し反応させ、405 nmの吸光度を測定した。その結果を図3に示す。

梗塞中心部、辺縁部いずれにおいても再灌流開始24時間後には脳組織中MIP-3  $\alpha$  タンパク質量は最大値に達することがわかった。またこれらの産生は低体温処置により著しく抑制されることが示された。以上の結果から、MIP-3  $\alpha$  タンパク質が虚血後の再灌流に伴い著しく産生誘導され、かつ低体温処置により顕著に抑制されることが明らかとなった。

#### 【0118】

実施例4 CCケモカイン受容体6 (CCR6) をコードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定

ラット腎臓由来CCR6およびラット肝臓由来CCR6を各々コードするcDNAをクローニングし、塩基配列を決定した。下記にそれぞれのクローニングとその塩基配列決定について示す。

まず、ラット腎臓Marathon-Ready cDNA (Clontech社) を鋳型とし、2種類のプライマー、プライマー1 (下記参照) およびプライマー2 (下記参照) を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は、上記cDNA 5  $\mu$  l を鋳型として使用し、Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech社) を4  $\mu$  l、プライマー1およびプライマー2を各0.4  $\mu$  M、dNTP mixtureを200  $\mu$  M、10 $\times$  cDNA PCR Reaction Buffer (Clontech社) を20  $\mu$  l 加え、200  $\mu$  l の液量とした。PCR反応は、94 $^{\circ}$ Cで1分間熱処理後、94 $^{\circ}$ Cで30秒、67 $^{\circ}$ Cで30秒、68 $^{\circ}$ Cで2分のサイクルを35回繰り返して行った。アガロースゲル電気泳動で増幅断片を確認後、PCR反応産物をTOPO TA Cloning Kit (Invitrogen社)

の処方に従いプラスミドベクターpCR 2.1-TOPO (Invitrogen社) へサブクローニングした。このプラスミドで大腸菌TOP10を形質転換し、cDNAが導入されたクローンをカナマイシンを含むLB寒天培地上で選択した。個々のクローンの塩基配列を解析した結果、ラットCCR6をコードするcDNA配列 (配列番号13) を得、そのプラスミドDNAをrCCR6-kidneyと名づけた。さらに、そのプラスミドDNAで大腸菌DH5 $\alpha$  (Invitrogen社) を形質転換し、その形質転換体

をDH5  $\alpha$ /rCCR6-kidneyと命名した。

次に、ラット肝臓Marathon-Ready cDNA (Clontech社) を鋳型とし、2種類のプライマー、プライマー2 (下記参照) およびプライマー3 (下記参照) を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は、上記cDNA 5  $\mu$  lを鋳型として使用し、Pyrobest DNA Polymerase (タカラバイオ社) を1  $\mu$  l、プライマー2およびプライマー3を各0.4  $\mu$  M、dNTP mixtureを200  $\mu$  M、10 $\times$ PyrobestII buffer (タカラバイオ社) を20  $\mu$  l加え、200  $\mu$  lの液量とした。PCR反応は、94 $^{\circ}$ Cで30秒間熱処理後、94 $^{\circ}$ Cで30秒、65 $^{\circ}$ Cで30秒、72 $^{\circ}$ Cで2分のサイクルを40回繰り返して行った。アガロースゲル電気泳動で増幅断片を確認後、PCR反応産物をZero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen社) の処方に従いプラスミドベクターpCR-BluntII-TOPO (Invitrogen社) へサブクローニングした。このプラスミドで大腸菌TOP10を形質転換し、cDNAが導入されたクローンをカナマイシンを含むLB寒天培地上で選択した。個々のクローンの塩基配列を解析した結果、ラットCCR6をコードするcDNA配列 (配列番号15) を得、そのプラスミドDNAをrCCR6-liverと名づけた。さらに、そのプラスミドDNAで大腸菌DH5  $\alpha$  (Invitrogen社) を形質転換し、その形質転換体をDH5  $\alpha$ /rCCR6-liverと命名した。

ラット腎臓由来CCR6 cDNAとラット肝臓由来CCR6 cDNAは、タンパク質コード領域の塩基配列において完全に一致しており、366アミノ酸からなるアミノ酸配列 (配列番号14) を有するタンパク質をコードしていた。該アミノ酸配列の疎水性プロット解析の結果は、このタンパク質が7回膜貫通ドメインを有することを示唆していた。

プライマー1: 5'-TGTATTGAAGACAGAACACTTGTGG-3' (配列番号16)

プライマー2: 5'-TCACATGTAATAGCAAGTTTCACAAAGG-3' (配列番号17)

プライマー3: 5'-GCATCTCACTACCCGTCTCTC-3' (配列番号18)

#### 【0119】

実施例5 ラット脳虚血モデルにおけるCCR6遺伝子の発現増加と低体温処置による発現減少

ラット局所脳虚血モデルでの脳組織におけるCCR6遺伝子の発現増加と低体

温処置による発現減少の有無を調べた。脳虚血モデルとしては、8週齢SD系雄性ラット(日本チャールズ・リバー社)を用いて中大脳動脈閉塞モデルを作成した(清田ら、*Experimental Brain Research*、95巻、388-396頁、1993年)。すなわち、ハロセン麻酔下で、シリコンコーティングした栓子を右側総頸動脈より中大脳動脈基始部まで挿入し、120分間閉塞した。その後、栓子除去による再灌流開始から0、2、4、6、8、24、48、96時間後に、一群あたり5匹のラットを屠殺・全脳を摘出、梗塞中心部および辺縁部を分取した後、各群ごとに1サンプルとしてまとめた。低体温処置群も同様に局所脳虚血に供した後、再灌流開始と同時に低温処置(ケージ内を冷風で冷やすことにより脳温が35℃を保つように維持)を開始し、虚血群と同様に2、4、6、8、24、48、96時間後に全脳を摘出、各群ごとに1サンプルとしてまとめた。上記の各脳組織サンプルを液体窒素下で粉碎した後、粉碎湿組織よりアイソジェン(ニッポンジーン社)を用いて添付書記載の方法に従ってトータルRNAを精製した。メッセージ・クリーンキット(ジーン・ハンター社)を用いて混入したゲノムDNAを除去した後、サーモスクリプトRT-PCRキット(GIBCO BRL社)を用いて1本鎖cDNAを合成した。得られたcDNAを鋳型として、定量的PCRによるCCR6遺伝子の発現量解析を行った。すなわち、実施例4(前項)でクローニングしたラットCCR6遺伝子配列をもとに2種類のオリゴヌクレオチド(配列番号19:5'-GGACGATGCGTTGTCATTTTC-3'; 配列番号20:5'-CCGCAGCTGCAGCGCCGAGAAA-3'、いずれもプロリゴ・ジャパン社に合成委託)を用いてラットCCR6遺伝子断片を増幅し、定量的PCRのための基準配列とした。定量的PCRの反応系には、プライマー・エクスプレス(アプライド・バイオシステムズ社)を用いて設計した定量的PCR用プライマーセット(配列番号19:5'-GGACGATGCGTTGTCATTTTC-3'、配列番号21:5'-GTGCCCCGGGTTTACTCAGAA-3'、いずれもプロリゴ・ジャパン社により委託合成)およびPCRクエンティテック・サイバーグリーンPCRマスターキット(キアジェン社)を使用した。一反応あたりポリA<sup>+</sup> RNA 0.8 ng量に相当する各ラットcDNAサンプル、または0から10<sup>6</sup>コピーの標準CCR6遺伝子断片を鋳型として用い、ABIプリズム7000(アプライド・バイオシステムズ社)を用いて

解析を行なった。CCR6 遺伝子発現量は、同一サンプル内の GAPDH 遺伝子発現量により標準化した。すなわち標準 CCR6 遺伝子から作成した検量線から、各サンプル内の CCR6 cDNA コピー数を算出すると同時に、タックマンローデント GAPDH・コントロールリジェント VIC プローブ (アプライド・バイオシステムズ社) を用いて同サンプル内の GAPDH cDNA コピー数を算出し、GAPDH cDNA 1 コピーあたりの CCR6 cDNA コピー数として算出した。その結果、図 5 に示すように、再灌流開始後、梗塞中心部では 4 時間から、辺縁部では 6 時間から CCR6 遺伝子の発現量が増加することが示された。また CCR6 遺伝子発現量は梗塞中心部、辺縁部ともに再灌流開始から 48 時間後に最大に達し、以後発現量は減少した。さらに、これらの発現は梗塞中心部では 8 時間後から、辺縁部では 24 時間後から、低体温処置により抑制されることが判明した。以上の結果から、CCR6 遺伝子は虚血後の再灌流に伴い著しく発現が誘導され、かつ低体温処置により顕著に抑制されることが示された。

#### 【0120】

##### 【発明の効果】

本発明の MIP-3 $\alpha$  は、脳・神経細胞傷害、例えば、脳血管障害の診断マーカーであり、したがって、該タンパク質の活性を阻害する物質、例えば、該タンパク質に対する中和抗体、該タンパク質の遺伝子発現を阻害する物質、例えば、本発明のアンチセンス核酸は、脳・神経細胞保護剤、特に脳梗塞、脳出血、くも膜下出血などの脳血管障害または頭部外傷時の脳・神経細胞保護剤として有用である。

#### 【0121】

##### 【配列表】

##### SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Pharmaceutical Use of MIP-3 $\alpha$  Suppressing Substance and Screening for Brain or Nerve Cell Protecting Substance

<130> B03095

<150> JP 2003-056885

<151> 2003-03-04

<160> 21

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 288

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(288)

<223>

<220>

<221> sig\_peptide

<222> (1)..(78)

<223>

<220>

<221> mat\_peptide

<222> (79)..()

<223>

&lt;400&gt; 1

atg tgc tgt acc aag agt ttg ctc ctg gct gct ttg atg tca gtg ctg 48  
 Met Cys Cys Thr Lys Ser Leu Leu Leu Ala Ala Leu Met Ser Val Leu  
 -25 -20 -15  
 cta ctc cac ctc tgc ggc gaa tca gaa gca gca agc aac ttt gac tgc 96  
 Leu Leu His Leu Cys Gly Glu Ser Glu Ala Ala Ser Asn Phe Asp Cys  
 -10 -5 -1 1 5 t  
 gt ctt gga tac aca gac cgt att ctt cat cct aaa ttt att gtg ggc 144C  
 ys Leu Gly Tyr Thr Asp Arg Ile Leu His Pro Lys Phe Ile Val Gly  
 10 15 20 t  
 tc aca cgg cag ctg gcc aat gaa ggc tgt gac atc aat gct atc atc 192P  
 he Thr Arg Gln Leu Ala Asn Glu Gly Cys Asp Ile Asn Ala Ile Ile  
 25 30 35 t  
 tt cac aca aag aaa aag ttg tct gtg tgc gca aat cca aaa cag act 240P  
 he His Thr Lys Lys Lys Leu Ser Val Cys Ala Asn Pro Lys Gln Thr  
 40 45 50  
 tgg gtg aaa tat att gtg cgt ctc ctc agt aaa aaa gtc aag aac atg 288  
 Trp Val Lys Tyr Ile Val Arg Leu Leu Ser Lys Lys Val Lys Asn Met  
 55 60 65 70

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 96

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Met Cys Cys Thr Lys Ser Leu Leu Leu Ala Ala Leu Met Ser Val Leu  
 -25 -20 -15

Leu Leu His Leu Cys Gly Glu Ser Glu Ala Ala Ser Asn Phe Asp Cys  
-10                      -5                      -1 1                      5  
Cys Leu Gly Tyr Thr Asp Arg Ile Leu His Pro Lys Phe Ile Val Gly  
                    10                      15                      20  
Phe Thr Arg Gln Leu Ala Asn Glu Gly Cys Asp Ile Asn Ala Ile Ile  
                    25                      30                      35  
Phe His Thr Lys Lys Lys Leu Ser Val Cys Ala Asn Pro Lys Gln Thr  
                    40                      45                      50  
Trp Val Lys Tyr Ile Val Arg Leu Leu Ser Lys Lys Val Lys Asn Met  
55                      60                      65                      70

<210> 3

<211> 288

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(288)

<223>

<220>

<221> sig\_peptide

<222> (1)..(75)

<223>

<220>

<221> mat\_peptide

<222> (76)..()

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 3

atg gcc tgc aag cat ctg ccc ttc ctg gct ttg gcg ggg gta ctg ctg	48
Met Ala Cys Lys His Leu Pro Phe Leu Ala Leu Ala Gly Val Leu Leu	
-25                      -20                      -15                      -10	
gct tac ctc tgc agc cag tca gaa gca gca agc aac ttt gac tgc tgc	96
Ala Tyr Leu Cys Ser Gln Ser Glu Ala Ala Ser Asn Phe Asp Cys Cys	
-5                      -1 1                      5	
ctc acg tac aca aag aac gtg tat cat cat gcg aga aat ttt gtg ggt	144
Leu Thr Tyr Thr Lys Asn Val Tyr His His Ala Arg Asn Phe Val Gly	
10                      15                      20	
ttc aca aca cag atg gcc gac gaa gct tgt gac att aat gct atc atc	192
Phe Thr Thr Gln Met Ala Asp Glu Ala Cys Asp Ile Asn Ala Ile Ile	
25                      30                      35	
ttt cac ctg aag tcg aaa aga tcc gtg tgc gct gac cca aag cag atc	240
Phe His Leu Lys Ser Lys Arg Ser Val Cys Ala Asp Pro Lys Gln Ile	
40                      45                      50                      55	
tgg gtg aaa agg att ttg cac ctc ctc agc cta aga acc aag aag atg	288
Trp Val Lys Arg Ile Leu His Leu Leu Ser Leu Arg Thr Lys Lys Met	
60                      65                      70	

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 96

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;400&gt; 4

Met Ala Cys Lys His Leu Pro Phe Leu Ala Leu Ala Gly Val Leu Leu



-25                      -20                      -15                      -10  
Ala Tyr Leu Cys Ser Gln Ser Glu Ala Ala Ser Asn Phe Asp Cys Cys  
                         -5                      -1 1                      5  
Leu Thr Tyr Thr Lys Asn Val Tyr His His Ala Arg Asn Phe Val Gly  
                         10                      15                      20  
Phe Thr Thr Gln Met Ala Asp Glu Ala Cys Asp Ile Asn Ala Ile Ile  
                         25                      30                      35  
Phe His Leu Lys Ser Lys Arg Ser Val Cys Ala Asp Pro Lys Gln Ile  
40                      45                      50                      55  
Trp Val Lys Arg Ile Leu His Leu Leu Ser Leu Arg Thr Lys Lys Met  
                         60                      65                      70

<210> 5

<211> 291

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(291)

<223>

<220>

<221> sig\_peptide

<222> (1)..(81)

<223>

<220>

<221> mat\_peptide

&lt;222&gt; (82)..()

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 5

atg gcc tgc ggt ggc aag cgt ctg ctc ttc ctt gct ttg gca tgg gta 48

Met Ala Cys Gly Gly Lys Arg Leu Leu Phe Leu Ala Leu Ala Trp Val

-25

-20

-15

ctg ctg gct cac ctc tgc agc cag gca gaa gca gca agc aac tac gac 96

Leu Leu Ala His Leu Cys Ser Gln Ala Glu Ala Ala Ser Asn Tyr Asp

-10

-5

-1 1

5

tgt tgc ctc tcg tac ata cag acg cct ctt cct tcc aga gct att gtg 144

Cys Cys Leu Ser Tyr Ile Gln Thr Pro Leu Pro Ser Arg Ala Ile Val

10

15

20

ggt ttc aca aga cag atg gcc gat gaa gct tgt gac att aat gct atc 192

Gly Phe Thr Arg Gln Met Ala Asp Glu Ala Cys Asp Ile Asn Ala Ile

25

30

35

atc ttt cac acg aag aaa aga aaa tct gtg tgc gct gat cca aag cag 240

Ile Phe His Thr Lys Lys Arg Lys Ser Val Cys Ala Asp Pro Lys Gln

40

45

50

aac tgg gtg aaa agg gct gtg aac ctc ctc agc cta aga gtc aag aag 288

Asn Trp Val Lys Arg Ala Val Asn Leu Leu Ser Leu Arg Val Lys Lys

55

60

65

atg 291

Met

70

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 97

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 6

Met Ala Cys Gly Gly Lys Arg Leu Leu Phe Leu Ala Leu Ala Trp Val  
                   -25                  -20                  -15  
 Leu Leu Ala His Leu Cys Ser Gln Ala Glu Ala Ala Ser Asn Tyr Asp  
           -10                  -5                  -1  1                  5  
 Cys Cys Leu Ser Tyr Ile Gln Thr Pro Leu Pro Ser Arg Ala Ile Val  
                   10                  15                  20  
 Gly Phe Thr Arg Gln Met Ala Asp Glu Ala Cys Asp Ile Asn Ala Ile  
                   25                  30                  35  
 Ile Phe His Thr Lys Lys Arg Lys Ser Val Cys Ala Asp Pro Lys Gln  
           40                  45                  50  
 Asn Trp Val Lys Arg Ala Val Asn Leu Leu Ser Leu Arg Val Lys Lys  
           55                  60                  65  
 Met  
 70

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 1122

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1122)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 7

atg agc ggg gaa tca atg aat ttc agc gat gtt ttc gac tcc agt gaa	48
Met Ser Gly Glu Ser Met Asn Phe Ser Asp Val Phe Asp Ser Ser Glu	
1                      5                      10                      15	
gat tat ttt gtg tca gtc aat act tca tat tac tca gtt gat tct gag	96
Asp Tyr Phe Val Ser Val Asn Thr Ser Tyr Tyr Ser Val Asp Ser Glu	
20                      25                      30	
atg tta ctg tgc tcc ttg cag gag gtc agg cag ttc tcc agg cta ttt	144
Met Leu Leu Cys Ser Leu Gln Glu Val Arg Gln Phe Ser Arg Leu Phe	
35                      40                      45	
gta ccg att gcc tac tcc ttg atc tgt gtc ttt ggc ctc ctg ggg aat	192
Val Pro Ile Ala Tyr Ser Leu Ile Cys Val Phe Gly Leu Leu Gly Asn	
50                      55                      60	
att ctg gtg gtg atc acc ttt gct ttt tat aag aag gcc agg tct atg	240
Ile Leu Val Val Ile Thr Phe Ala Phe Tyr Lys Lys Ala Arg Ser Met	
65                      70                      75                      80	
aca gac gtc tat ctc ttg aac atg gcc att gca gac atc ctc ttt gtt	288
Thr Asp Val Tyr Leu Leu Asn Met Ala Ile Ala Asp Ile Leu Phe Val	
85                      90                      95	
ctt act ctc cca ttc tgg gca gtg agt cat gcc act ggt gcg tgg gtt	336
Leu Thr Leu Pro Phe Trp Ala Val Ser His Ala Thr Gly Ala Trp Val	
100                      105                      110	
ttc agc aat gcc acg tgc aag ttg cta aaa ggc atc tat gcc atc aac	384
Phe Ser Asn Ala Thr Cys Lys Leu Leu Lys Gly Ile Tyr Ala Ile Asn	
115                      120                      125	
ttt aac tgc ggg atg ctg ctc ctg act tgc att agc atg gac cgg tac	432
Phe Asn Cys Gly Met Leu Leu Leu Thr Cys Ile Ser Met Asp Arg Tyr	
130                      135                      140	
atc gcc att gta cag gcg act aag tca ttc cgg ctc cga tcc aga aca	480
Ile Ala Ile Val Gln Ala Thr Lys Ser Phe Arg Leu Arg Ser Arg Thr	

145	150	155	160	
cta ccg cgc agc aaa atc atc tgc ctt gtt gtg tgg ggg ctg tca gtc				528
Leu Pro Arg Ser Lys Ile Ile Cys Leu Val Val Trp Gly Leu Ser Val				
165	170	175		
atc atc tcc agc tca act ttt gtc ttc aac caa aaa tac aac acc caa				576
Ile Ile Ser Ser Ser Thr Phe Val Phe Asn Gln Lys Tyr Asn Thr Gln				
180	185	190		
ggc agc gat gtc tgt gaa ccc aag tac cag act gtc tcg gag ccc atc				624
Gly Ser Asp Val Cys Glu Pro Lys Tyr Gln Thr Val Ser Glu Pro Ile				
195	200	205		
agg tgg aag ctg ctg atg ttg ggg ctt gag cta ctc ttt ggt ttc ttt				672
Arg Trp Lys Leu Leu Met Leu Gly Leu Glu Leu Leu Phe Gly Phe Phe				
210	215	220		
atc cct ttg atg ttc atg ata ttt tgt tac acg ttc att gtc aaa acc				720
Ile Pro Leu Met Phe Met Ile Phe Cys Tyr Thr Phe Ile Val Lys Thr				
225	230	235	240	
ttg gtg caa gct cag aat tct aaa agg cac aaa gcc atc cgt gta atc				768
Leu Val Gln Ala Gln Asn Ser Lys Arg His Lys Ala Ile Arg Val Ile				
245	250	255		
ata gct gtg gtg ctt gtg ttt ctg gct tgt cag att cct cat aac atg				816
Ile Ala Val Val Leu Val Phe Leu Ala Cys Gln Ile Pro His Asn Met				
260	265	270		
gtc ctg ctt gtg acg gct gca aat ttg ggt aaa atg aac cga tcc tgc				864
Val Leu Leu Val Thr Ala Ala Asn Leu Gly Lys Met Asn Arg Ser Cys				
275	280	285		
cag agc gaa aag cta att ggc tat acg aaa act gtc aca gaa gtc ctg				912
Gln Ser Glu Lys Leu Ile Gly Tyr Thr Lys Thr Val Thr Glu Val Leu				
290	295	300		
gct ttc ctg cac tgc tgc ctg aac cct gtg ctc tac gct ttt att ggg				960

Ala Phe Leu His Cys Cys Leu Asn Pro Val Leu Tyr Ala Phe Ile Gly  
 305                      310                      315                      320  
 cag aag ttc aga aac tac ttt ctg aag atc ttg aag gac ctg tgg tgt      1008  
 Gln Lys Phe Arg Asn Tyr Phe Leu Lys Ile Leu Lys Asp Leu Trp Cys  
                          325                      330                      335  
 gtg aga agg aag tac aag tcc tca ggc ttc tcc tgt gcc ggg agg tac      1056  
 Val Arg Arg Lys Tyr Lys Ser Ser Gly Phe Ser Cys Ala Gly Arg Tyr  
                          340                      345                      350  
 tca gaa aac att tct cgg cag acc agt gag acc gca gat aac gac aat      1104  
 Ser Glu Asn Ile Ser Arg Gln Thr Ser Glu Thr Ala Asp Asn Asp Asn  
                          355                      360                      365  
 gcg tcg tcc ttc act atg    1122  
 Ala Ser Ser Phe Thr Met  
                          370

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 374

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 8

Met Ser Gly Glu Ser Met Asn Phe Ser Asp Val Phe Asp Ser Ser Glu  
 1                      5                      10                      15  
 Asp Tyr Phe Val Ser Val Asn Thr Ser Tyr Tyr Ser Val Asp Ser Glu  
                          20                      25                      30  
 Met Leu Leu Cys Ser Leu Gln Glu Val Arg Gln Phe Ser Arg Leu Phe  
                          35                      40                      45  
 Val Pro Ile Ala Tyr Ser Leu Ile Cys Val Phe Gly Leu Leu Gly Asn  
                          50                      55                      60

Ile	Leu	Val	Val	Ile	Thr	Phe	Ala	Phe	Tyr	Lys	Lys	Ala	Arg	Ser	Met	
65					70					75					80	
Thr	Asp	Val	Tyr	Leu	Leu	Asn	Met	Ala	Ile	Ala	Asp	Ile	Leu	Phe	Val	
				85						90				95		
Leu	Thr	Leu	Pro	Phe	Trp	Ala	Val	Ser	His	Ala	Thr	Gly	Ala	Trp	Val	
			100					105					110			
Phe	Ser	Asn	Ala	Thr	Cys	Lys	Leu	Leu	Lys	Gly	Ile	Tyr	Ala	Ile	Asn	
		115					120					125				
Phe	Asn	Cys	Gly	Met	Leu	Leu	Leu	Thr	Cys	Ile	Ser	Met	Asp	Arg	Tyr	
	130					135					140					
Ile	Ala	Ile	Val	Gln	Ala	Thr	Lys	Ser	Phe	Arg	Leu	Arg	Ser	Arg	Thr	
145				150					155					160		
Leu	Pro	Arg	Ser	Lys	Ile	Ile	Cys	Leu	Val	Val	Trp	Gly	Leu	Ser	Val	
				165				170					175			
Ile	Ile	Ser	Ser	Ser	Thr	Phe	Val	Phe	Asn	Gln	Lys	Tyr	Asn	Thr	Gln	
		180						185					190			
Gly	Ser	Asp	Val	Cys	Glu	Pro	Lys	Tyr	Gln	Thr	Val	Ser	Glu	Pro	Ile	
	195						200					205				
Arg	Trp	Lys	Leu	Leu	Met	Leu	Gly	Leu	Glu	Leu	Leu	Phe	Gly	Phe	Phe	
	210					215					220					
Ile	Pro	Leu	Met	Phe	Met	Ile	Phe	Cys	Tyr	Thr	Phe	Ile	Val	Lys	Thr	
225				230					235					240		
Leu	Val	Gln	Ala	Gln	Asn	Ser	Lys	Arg	His	Lys	Ala	Ile	Arg	Val	Ile	
				245					250					255		
Ile	Ala	Val	Val	Leu	Val	Phe	Leu	Ala	Cys	Gln	Ile	Pro	His	Asn	Met	
		260						265					270			
Val	Leu	Leu	Val	Thr	Ala	Ala	Asn	Leu	Gly	Lys	Met	Asn	Arg	Ser	Cys	
		275					280						285			
Gln	Ser	Glu	Lys	Leu	Ile	Gly	Tyr	Thr	Lys	Thr	Val	Thr	Glu	Val	Leu	

290                      295                      300  
 Ala Phe Leu His Cys Cys Leu Asn Pro Val Leu Tyr Ala Phe Ile Gly  
 305                      310                      315                      320  
 Gln Lys Phe Arg Asn Tyr Phe Leu Lys Ile Leu Lys Asp Leu Trp Cys  
                          325                      330                      335  
 Val Arg Arg Lys Tyr Lys Ser Ser Gly Phe Ser Cys Ala Gly Arg Tyr  
                          340                      345                      350  
 Ser Glu Asn Ile Ser Arg Gln Thr Ser Glu Thr Ala Asp Asn Asp Asn  
                          355                      360                      365  
 Ala Ser Ser Phe Thr Met  
 370

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 1101

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1101)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 9

atg aat tcc aca gag tcc tac ttt gga acg gat gat tat gac aac aca                      48  
 Met Asn Ser Thr Glu Ser Tyr Phe Gly Thr Asp Asp Tyr Asp Asn Thr  
 1                      5                      10                      15  
 gag tat tat tct att cct cca gac cat ggg cca tgc tcc cta gaa gag                      96  
 Glu Tyr Tyr Ser Ile Pro Pro Asp His Gly Pro Cys Ser Leu Glu Glu  
                          20                      25                      30



gtc aga aac ttc acc aag gta ttt gtg cca att gcc tac tcc tta ata 144  
 Val Arg Asn Phe Thr Lys Val Phe Val Pro Ile Ala Tyr Ser Leu Ile  
 35 40 45  
 tgt gtc ttt ggc ctc ctg ggc aac att atg gtg gtg atg acc ttt gcc 192  
 Cys Val Phe Gly Leu Leu Gly Asn Ile Met Val Val Met Thr Phe Ala  
 50 55 60  
 ttc tac aag aaa gcc aga tcc atg act gac gtc tac ctg ttg aac atg 240  
 Phe Tyr Lys Lys Ala Arg Ser Met Thr Asp Val Tyr Leu Leu Asn Met  
 65 70 75 80  
 gcc atc aca gac ata ctc ttt gtc ctc acc cta ccg ttc tgg gca gtt 288  
 Ala Ile Thr Asp Ile Leu Phe Val Leu Thr Leu Pro Phe Trp Ala Val  
 85 90 95  
 act cat gcc acc aac act tgg gtt ttc agc gat gca ctg tgt aaa ctg 336  
 Thr His Ala Thr Asn Thr Trp Val Phe Ser Asp Ala Leu Cys Lys Leu  
 100 105 110  
 atg aaa ggc aca tat gcg gtc aac ttt aac tgt ggg atg ctg ctc ctg 384  
 Met Lys Gly Thr Tyr Ala Val Asn Phe Asn Cys Gly Met Leu Leu Leu  
 115 120 125  
 gcc tgt atc agc atg gac cgg tac att gcc atc gtc cag gca acc aaa 432  
 Ala Cys Ile Ser Met Asp Arg Tyr Ile Ala Ile Val Gln Ala Thr Lys  
 130 135 140  
 tct ttc cgg gta cgc tcc aga aca ctg acg cac agt aag gtc atc tgt 480  
 Ser Phe Arg Val Arg Ser Arg Thr Leu Thr His Ser Lys Val Ile Cys  
 145 150 155 160  
 gtg gca gtg tgg ttc atc tcc atc atc atc tca agc cct aca ttt atc 528  
 Val Ala Val Trp Phe Ile Ser Ile Ile Ile Ser Ser Pro Thr Phe Ile  
 165 170 175  
 ttc aac aag aaa tac gag ctg cag gat cgt gat gtc tgt gag cca cgg 576  
 Phe Asn Lys Lys Tyr Glu Leu Gln Asp Arg Asp Val Cys Glu Pro Arg

180	185	190	
tac agg tct gtc tca gag ccc atc acg tgg aag ctg ctg ggt atg gga			624
Tyr Arg Ser Val Ser Glu Pro Ile Thr Trp Lys Leu Leu Gly Met Gly			
195	200	205	
ctg gag ctg ttc ttt ggg ttc ttc acc cct ttg ctg ttt atg gtg ttc			672
Leu Glu Leu Phe Phe Gly Phe Phe Thr Pro Leu Leu Phe Met Val Phe			
210	215	220	
tgc tat ctg ttc att atc aag acc ttg gtg cag gcc cag aac tcc aag			720
Cys Tyr Leu Phe Ile Ile Lys Thr Leu Val Gln Ala Gln Asn Ser Lys			
225	230	235	240
agg cac aga gcc atc cga gtc gtg atc gct gtg gtt ctc gtg ttc ctg			768
Arg His Arg Ala Ile Arg Val Val Ile Ala Val Val Leu Val Phe Leu			
245	250	255	
gct tgt cag atc cct cac aac atg gtc ctc ctc gtg act gcg gtc aac			816
Ala Cys Gln Ile Pro His Asn Met Val Leu Leu Val Thr Ala Val Asn			
260	265	270	
acg ggc aaa gtg ggc cgg agc tgc agc acc gag aaa gtc ctc gcc tac			864
Thr Gly Lys Val Gly Arg Ser Cys Ser Thr Glu Lys Val Leu Ala Tyr			
275	280	285	
acc agg aac gtg gcc gag gtc ctg gct ttc ctg cat tgc tgc ctc aac			912
Thr Arg Asn Val Ala Glu Val Leu Ala Phe Leu His Cys Cys Leu Asn			
290	295	300	
ccc gtg ttg tat gcg ttt att gga cag aaa ttc aga aac tac ttc atg			960
Pro Val Leu Tyr Ala Phe Ile Gly Gln Lys Phe Arg Asn Tyr Phe Met			
305	310	315	320
aag atc atg aag gat gtg tgg tgt atg aga agg aag aat aag atg cct			1008
Lys Ile Met Lys Asp Val Trp Cys Met Arg Arg Lys Asn Lys Met Pro			
325	330	335	
ggc ttc ctc tgt gcc cgg gtt tac tcg gaa agc tac atc tcc agg cag			1056

Gly Phe Leu Cys Ala Arg Val Tyr Ser Glu Ser Tyr Ile Ser Arg Gln

340

345

350

acc agt gag acc gtc gaa aat gat aat gca tcg tcc ttt acc atg 1101

Thr Ser Glu Thr Val Glu Asn Asp Asn Ala Ser Ser Phe Thr Met

355

360

365

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 367

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 10

Met Asn Ser Thr Glu Ser Tyr Phe Gly Thr Asp Asp Tyr Asp Asn Thr

1

5

10

15

Glu Tyr Tyr Ser Ile Pro Pro Asp His Gly Pro Cys Ser Leu Glu Glu

20

25

30

Val Arg Asn Phe Thr Lys Val Phe Val Pro Ile Ala Tyr Ser Leu Ile

35

40

45

Cys Val Phe Gly Leu Leu Gly Asn Ile Met Val Val Met Thr Phe Ala

50

55

60

Phe Tyr Lys Lys Ala Arg Ser Met Thr Asp Val Tyr Leu Leu Asn Met

65

70

75

80

Ala Ile Thr Asp Ile Leu Phe Val Leu Thr Leu Pro Phe Trp Ala Val

85

90

95

Thr His Ala Thr Asn Thr Trp Val Phe Ser Asp Ala Leu Cys Lys Leu

100

105

110

Met Lys Gly Thr Tyr Ala Val Asn Phe Asn Cys Gly Met Leu Leu Leu

115

120

125

Ala Cys Ile Ser Met Asp Arg Tyr Ile Ala Ile Val Gln Ala Thr Lys

130 135 140  
Ser Phe Arg Val Arg Ser Arg Thr Leu Thr His Ser Lys Val Ile Cys  
145 150 155 160  
Val Ala Val Trp Phe Ile Ser Ile Ile Ile Ser Ser Pro Thr Phe Ile  
165 170 175  
Phe Asn Lys Lys Tyr Glu Leu Gln Asp Arg Asp Val Cys Glu Pro Arg  
180 185 190  
Tyr Arg Ser Val Ser Glu Pro Ile Thr Trp Lys Leu Leu Gly Met Gly  
195 200 205  
Leu Glu Leu Phe Phe Gly Phe Phe Thr Pro Leu Leu Phe Met Val Phe  
210 215 220  
Cys Tyr Leu Phe Ile Ile Lys Thr Leu Val Gln Ala Gln Asn Ser Lys  
225 230 235 240  
Arg His Arg Ala Ile Arg Val Val Ile Ala Val Val Leu Val Phe Leu  
245 250 255  
Ala Cys Gln Ile Pro His Asn Met Val Leu Leu Val Thr Ala Val Asn  
260 265 270  
Thr Gly Lys Val Gly Arg Ser Cys Ser Thr Glu Lys Val Leu Ala Tyr  
275 280 285  
Thr Arg Asn Val Ala Glu Val Leu Ala Phe Leu His Cys Cys Leu Asn  
290 295 300  
Pro Val Leu Tyr Ala Phe Ile Gly Gln Lys Phe Arg Asn Tyr Phe Met  
305 310 315 320  
Lys Ile Met Lys Asp Val Trp Cys Met Arg Arg Lys Asn Lys Met Pro  
325 330 335  
Gly Phe Leu Cys Ala Arg Val Tyr Ser Glu Ser Tyr Ile Ser Arg Gln  
340 345 350  
Thr Ser Glu Thr Val Glu Asn Asp Asn Ala Ser Ser Phe Thr Met  
355 360 365

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for amplifying fragment  
of rat MIP-3  $\alpha$  gene transcript.

<400> 11

agaatggcct gcaagcatct

20

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc\_feature

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for amplifying fragment  
of rat MIP-3  $\alpha$  gene transcript.

<400> 12

tgcagaggta agccagcagt a

21

<210> 13

<211> 1502

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rattus norvegicus (kidney)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (343)..(1443)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 13

tgtattgaag acagaacact tgttgtaaga caccaccccc cgggagggcg aagaacaagc	60
cacacactgc tttgaagagt ccagcccca gcagaactgc aagggcagac actgttctgg	120
ccacctgcag tttgaagtca tcactttcaa tccccctgtg actagggcca gggctctcac	180
acctgcgaga ggaagcaaag atctaagcaa tctgaatttt aagagagaaa ctgcagctgt	240
cggtttgtgg gccggaacat tattggactg gagcctggac aagcactaag gcgggggtac	300
ctggccagcc cacttcggag ctcagcgttt ccttgggaaa cg atg aat ttc acc	354

Met Asn Phe Thr

1

gag gcc aac tac gga atg gaa gat tat act ggc tca gat tac tct atg	402
Glu Ala Asn Tyr Gly Met Glu Asp Tyr Thr Gly Ser Asp Tyr Ser Met	

5	10	15	20	
ttt cca gag acc gag cca tgc tct ctg caa gag gtc aga gac ttc acc	450			
Phe Pro Glu Thr Glu Pro Cys Ser Leu Gln Glu Val Arg Asp Phe Thr				

25	30	35	
aag gtg ttc gtg cca atc gcc tac tcc tta atc tgt gtc ttt ggc ctc	498		
Lys Val Phe Val Pro Ile Ala Tyr Ser Leu Ile Cys Val Phe Gly Leu			

40	45	50	
ctt ggc aat att atg gtg gtg ata acc ttt gcc ttc tac aag aaa gcc	546		
Leu Gly Asn Ile Met Val Val Ile Thr Phe Ala Phe Tyr Lys Lys Ala			

55

60

65

agg tcc atg act gac gtc tac cta ttg aac atg gcc atc aca gac ata 594  
 Arg Ser Met Thr Asp Val Tyr Leu Leu Asn Met Ala Ile Thr Asp Ile  
 70 75 80  
 ctc ttt gtc ctc acc cta cca ttc tgg gca gtt act cat gcc act gac 642  
 Leu Phe Val Leu Thr Leu Pro Phe Trp Ala Val Thr His Ala Thr Asp  
 85 90 95 100  
 act tgg atc ttt ggc aac acg atg tgt aaa ctg atg aaa ggc acg tat 690  
 Thr Trp Ile Phe Gly Asn Thr Met Cys Lys Leu Met Lys Gly Thr Tyr  
 105 110 115  
 gcg gtc aac ttt aac tgt ggg atg ctg ctc ctg gcc tgt atc agc atg 738  
 Ala Val Asn Phe Asn Cys Gly Met Leu Leu Leu Ala Cys Ile Ser Met  
 120 125 130  
 gac cgg tac att gcc atc gtc cag gcg acc aaa tct ttc cgg gta cgc 786  
 Asp Arg Tyr Ile Ala Ile Val Gln Ala Thr Lys Ser Phe Arg Val Arg  
 135 140 145  
 tcc aga aca ctg acg cac agt aag gtc atc tgt ctg acg gtg tgg ttc 834  
 Ser Arg Thr Leu Thr His Ser Lys Val Ile Cys Leu Thr Val Trp Phe  
 150 155 160  
 gtt tcc atc atc atc tca agc ccc aca ttc ttc ttc aac aag caa tac 882  
 Val Ser Ile Ile Ile Ser Ser Pro Thr Phe Phe Phe Asn Lys Gln Tyr  
 165 170 175 180  
 aag ctg cag ggc cgt gat gtc tgc gag cct cag tac aag ctc gtc tcg 930  
 Lys Leu Gln Gly Arg Asp Val Cys Glu Pro Gln Tyr Lys Leu Val Ser  
 185 190 195  
 gag ccc atc acg tgg aaa ctg ctg ggc atg gga ctc gag ctg ctc ttt 978  
 Glu Pro Ile Thr Trp Lys Leu Leu Gly Met Gly Leu Glu Leu Leu Phe  
 200 205 210  
 ggc ttc ttc atc cct ttg ctg ttt atg gtg ttc tgt tac ctg ttc atc 1026  
 Gly Phe Phe Ile Pro Leu Leu Phe Met Val Phe Cys Tyr Leu Phe Ile

215	220	225	
atc aag acc ttg gtg cag gcc cag aat tcc aag agg cac aga gcc atc			1074
Ile Lys Thr Leu Val Gln Ala Gln Asn Ser Lys Arg His Arg Ala Ile			
230	235	240	
cga gtc gtg att gct gtg gtt ctc gtg ttc ctg gct tgt cag atc cct			1122
Arg Val Val Ile Ala Val Val Leu Val Phe Leu Ala Cys Gln Ile Pro			
245	250	255	260
cac aac atg gtc ctc ctc gtg act gca gcc aac acg ggc aaa atg ggc			1170
His Asn Met Val Leu Leu Val Thr Ala Ala Asn Thr Gly Lys Met Gly			
265	270	275	
cgc agc tgc agc gcc gag aaa gcc ctc gcc tac gcc agg aat gtg gct			1218
Arg Ser Cys Ser Ala Glu Lys Ala Leu Ala Tyr Ala Arg Asn Val Ala			
280	285	290	
gag gtc ctg gct ttc ctg cac tgc tgt ctc aac ccc gtg ttg tat gcc			1266
Glu Val Leu Ala Phe Leu His Cys Cys Leu Asn Pro Val Leu Tyr Ala			
295	300	305	
ttc att gga cag aaa ttc aga agc tac ttc atg aag atc atg aag gat			1314
Phe Ile Gly Gln Lys Phe Arg Ser Tyr Phe Met Lys Ile Met Lys Asp			
310	315	320	
gtg tgg tgt atg agg agg aag agc aag gtg cct acc ttc ttc tgt gcc			1362
Val Trp Cys Met Arg Arg Lys Ser Lys Val Pro Thr Phe Phe Cys Ala			
325	330	335	340
cgg gtt tac tca gaa agc tac atc tcc agg cag acc agt gag act gta			1410
Arg Val Tyr Ser Glu Ser Tyr Ile Ser Arg Gln Thr Ser Glu Thr Val			
345	350	355	
gaa aat gac aac gca tcg tcc ttt acc atg taa cacgagagca caaagcagca			1463
Glu Asn Asp Asn Ala Ser Ser Phe Thr Met			
360	365		
tgccccgaaa gcctttgtga aacttgctat tacatgtga			1502



&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 366

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;400&gt; 14

Met Asn Phe Thr Glu Ala Asn Tyr Gly Met Glu Asp Tyr Thr Gly Ser  
 1                    5                    10                    15  
 Asp Tyr Ser Met Phe Pro Glu Thr Glu Pro Cys Ser Leu Gln Glu Val  
                   20                    25                    30  
 Arg Asp Phe Thr Lys Val Phe Val Pro Ile Ala Tyr Ser Leu Ile Cys  
                   35                    40                    45  
 Val Phe Gly Leu Leu Gly Asn Ile Met Val Val Ile Thr Phe Ala Phe  
                   50                    55                    60  
 Tyr Lys Lys Ala Arg Ser Met Thr Asp Val Tyr Leu Leu Asn Met Ala  
 65                    70                    75                    80  
 Ile Thr Asp Ile Leu Phe Val Leu Thr Leu Pro Phe Trp Ala Val Thr  
                   85                    90                    95  
 His Ala Thr Asp Thr Trp Ile Phe Gly Asn Thr Met Cys Lys Leu Met  
                   100                    105                    110  
 Lys Gly Thr Tyr Ala Val Asn Phe Asn Cys Gly Met Leu Leu Leu Ala  
                   115                    120                    125  
 Cys Ile Ser Met Asp Arg Tyr Ile Ala Ile Val Gln Ala Thr Lys Ser  
                   130                    135                    140  
 Phe Arg Val Arg Ser Arg Thr Leu Thr His Ser Lys Val Ile Cys Leu  
 145                    150                    155                    160  
 Thr Val Trp Phe Val Ser Ile Ile Ile Ser Ser Pro Thr Phe Phe Phe  
                   165                    170                    175

Asn Lys Gln Tyr Lys Leu Gln Gly Arg Asp Val Cys Glu Pro Gln Tyr  
180 185 190  
Lys Leu Val Ser Glu Pro Ile Thr Trp Lys Leu Leu Gly Met Gly Leu  
195 200 205  
Glu Leu Leu Phe Gly Phe Phe Ile Pro Leu Leu Phe Met Val Phe Cys  
210 215 220  
Tyr Leu Phe Ile Ile Lys Thr Leu Val Gln Ala Gln Asn Ser Lys Arg  
225 230 235 240  
His Arg Ala Ile Arg Val Val Ile Ala Val Val Leu Val Phe Leu Ala  
245 250 255  
Cys Gln Ile Pro His Asn Met Val Leu Leu Val Thr Ala Ala Asn Thr  
260 265 270  
Gly Lys Met Gly Arg Ser Cys Ser Ala Glu Lys Ala Leu Ala Tyr Ala  
275 280 285  
Arg Asn Val Ala Glu Val Leu Ala Phe Leu His Cys Cys Leu Asn Pro  
290 295 300  
Val Leu Tyr Ala Phe Ile Gly Gln Lys Phe Arg Ser Tyr Phe Met Lys  
305 310 315 320  
Ile Met Lys Asp Val Trp Cys Met Arg Arg Lys Ser Lys Val Pro Thr  
325 330 335  
Phe Phe Cys Ala Arg Val Tyr Ser Glu Ser Tyr Ile Ser Arg Gln Thr  
340 345 350  
Ser Glu Thr Val Glu Asn Asp Asn Ala Ser Ser Phe Thr Met  
355 360 365

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 1309

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rattus norvegicus (liver)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (150)..(1250)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 15

gcattctcact acccggtctct caatgagcac cgctggttgt gcctgtcaac agaatagtcc	60
tctcacactt aggactggag cctggacaag cactaaggcg ggggtacctg gccagcccac	120
ttcggagctc agcgtttcct tgggaaacg atg aat ttc acc gag gcc aac tac	173
Met Asn Phe Thr Glu Ala Asn Tyr	
1 5	
gga atg gaa gat tat act ggc tca gat tac tct atg ttt cca gag acc	221
Gly Met Glu Asp Tyr Thr Gly Ser Asp Tyr Ser Met Phe Pro Glu Thr	
10 15 20	
gag cca tgc tct ctg caa gag gtc aga gac ttc acc aag gtg ttc gtg	269
Glu Pro Cys Ser Leu Gln Glu Val Arg Asp Phe Thr Lys Val Phe Val	
25 30 35 40	
cca atc gcc tac tcc tta atc tgt gtc ttt ggc ctc ctt ggc aat att	317
Pro Ile Ala Tyr Ser Leu Ile Cys Val Phe Gly Leu Leu Gly Asn Ile	
45 50 55	
atg gtg gtg ata acc ttt gcc ttc tac aag aaa gcc agg tcc atg act	365
Met Val Val Ile Thr Phe Ala Phe Tyr Lys Lys Ala Arg Ser Met Thr	
60 65 70	
gac gtc tac cta ttg aac atg gcc atc aca gac ata ctc ttt gtc ctc	413
Asp Val Tyr Leu Leu Asn Met Ala Ile Thr Asp Ile Leu Phe Val Leu	
75 80 85	
acc cta cca ttc tgg gca gtt act cat gcc act gac act tgg atc ttt	461
Thr Leu Pro Phe Trp Ala Val Thr His Ala Thr Asp Thr Trp Ile Phe	

90	95	100	
ggc aac acg atg tgt aaa ctg atg aaa ggc acg tat gcg gtc aac ttt			509
Gly Asn Thr Met Cys Lys Leu Met Lys Gly Thr Tyr Ala Val Asn Phe			
105	110	115	120
aac tgt ggg atg ctg ctc ctg gcc tgt atc agc atg gac cgg tac att			557
Asn Cys Gly Met Leu Leu Leu Ala Cys Ile Ser Met Asp Arg Tyr Ile			
125	130	135	
gcc atc gtc cag gcg acc aaa tct ttc cgg gta cgc tcc aga aca ctg			605
Ala Ile Val Gln Ala Thr Lys Ser Phe Arg Val Arg Ser Arg Thr Leu			
140	145	150	
acg cac agt aag gtc atc tgt ctg acg gtg tgg ttc gtt tcc atc atc			653
Thr His Ser Lys Val Ile Cys Leu Thr Val Trp Phe Val Ser Ile Ile			
155	160	165	
atc tca agc ccc aca ttc ttc ttc aac aag caa tac aag ctg cag ggc			701
Ile Ser Ser Pro Thr Phe Phe Phe Asn Lys Gln Tyr Lys Leu Gln Gly			
170	175	180	
cgt gat gtc tgc gag cct cag tac aag ctc gtc tcg gag ccc atc acg			749
Arg Asp Val Cys Glu Pro Gln Tyr Lys Leu Val Ser Glu Pro Ile Thr			
185	190	195	200
tgg aaa ctg ctg ggc atg gga ctc gag ctg ctc ttt ggc ttc ttc atc			797
Trp Lys Leu Leu Gly Met Gly Leu Glu Leu Leu Phe Gly Phe Phe Ile			
205	210	215	
cct ttg ctg ttt atg gtg ttc tgt tac ctg ttc atc atc aag acc ttg			845
Pro Leu Leu Phe Met Val Phe Cys Tyr Leu Phe Ile Ile Lys Thr Leu			
220	225	230	
gtg cag gcc cag aat tcc aag agg cac aga gcc atc cga gtc gtg att			893
Val Gln Ala Gln Asn Ser Lys Arg His Arg Ala Ile Arg Val Val Ile			
235	240	245	
gct gtg gtt ctc gtg ttc ctg gct tgt cag atc cct cac aac atg gtc			941

Ala Val Val Leu Val Phe Leu Ala Cys Gln Ile Pro His Asn Met Val  
 250 255 260  
 ctc ctc gtg act gca gcc aac acg ggc aaa atg ggc cgc agc tgc agc 989  
 Leu Leu Val Thr Ala Ala Asn Thr Gly Lys Met Gly Arg Ser Cys Ser  
 265 270 275 280  
 gcc gag aaa gcc ctc gcc tac gcc agg aat gtg gct gag gtc ctg gct 1037  
 Ala Glu Lys Ala Leu Ala Tyr Ala Arg Asn Val Ala Glu Val Leu Ala  
 285 290 295  
 ttc ctg cac tgc tgt ctc aac ccc gtg ttg tat gcc ttc att gga cag 1085  
 Phe Leu His Cys Cys Leu Asn Pro Val Leu Tyr Ala Phe Ile Gly Gln  
 300 305 310  
 aaa ttc aga agc tac ttc atg aag atc atg aag gat gtg tgg tgt atg 1133  
 Lys Phe Arg Ser Tyr Phe Met Lys Ile Met Lys Asp Val Trp Cys Met  
 315 320 325  
 agg agg aag agc aag gtg cct acc ttc ttc tgt gcc cgg gtt tac tca 1181  
 Arg Arg Lys Ser Lys Val Pro Thr Phe Phe Cys Ala Arg Val Tyr Ser  
 330 335 340  
 gaa agc tac atc tcc agg cag acc agt gag act gta gaa aat gac aac 1229  
 Glu Ser Tyr Ile Ser Arg Gln Thr Ser Glu Thr Val Glu Asn Asp Asn  
 345 350 355 360  
 gca tcg tcc ttt acc atg taa cacgagagca caaagcagca tgccccgaaa 1280  
 Ala Ser Ser Phe Thr Met  
 365  
 gcctttgtga aacttgctat tacatgtga 1309

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for amplifying CCR6  
cDNA derived from rat kidney.

<400> 16

tgtattgaag acagaacact tgtgg

25

<210> 17

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for amplifying CCR6  
cDNA derived from rat kidney or rat liver.

<400> 17

tcacatgtaa tagcaagttt cacaaagg

28

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for amplifying CCR6  
cDNA derived from rat liver.

<400> 18

gcattctcact acccgtctct c

21

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for amplifying fragment  
of rat CCR6 gene transcript.

<400> 19

ggacgatgcg ttgtcatttt c

21

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for amplifying fragment  
of rat CCR6 gene transcript.

<400> 20

ccgcagctgc agcgccgaga aa

22

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for amplifying fragment of rat CCR6 gene transcript.

<400> 21

gtgcccgggt ttactcagaa

20

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図 1】

ラット脳虚血モデルの梗塞巣中心部（A）および辺縁部（B）における再灌流後のMIP-3 $\alpha$ 遺伝子の発現の経時変化、およびそれに及ぼす低体温処置の効果を示す図である。図中、Cはコントロール、即ち無処置ラット脳由来のcDNAを鋳型とした場合である。

##### 【図 2】

ラット脳虚血モデルにおいて、中和活性を有する抗ラットMIP-3 $\alpha$ モノクローナル抗体の脳梗塞容積に及ぼす効果を示す図である。Aは虚血処置直前に抗体を投与したラットから虚血処置1日後に摘出した脳における梗塞容積、Bは虚血後再灌流の直後に抗体を投与したラットにおける2日後の脳梗塞容積をそれぞれ示す。図中、\*はStudent t-testにより、コントロール抗体群に対して $p<0.05$ であることを示す。

##### 【図 3】

ラット脳虚血モデルの梗塞巣中心部（NA）および辺縁部（NB）における再灌流後のMIP-3 $\alpha$ タンパク質の産生の経時変化、およびそれに及ぼす低体温処置の効果〔梗塞巣中心部（HA）、辺縁部（HB）〕を示す図である。図中、Nはコントロール、即ち無処置ラット脳由来の可溶化画分を示す。

##### 【図 4】

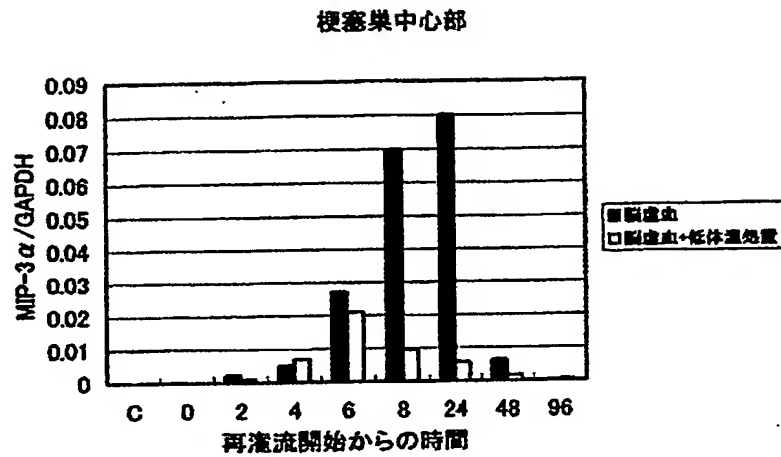


ラット脳虚血モデルの梗塞巣中心部（A）および辺縁部（B）における再灌流後のCCR6遺伝子の発現の経時変化、およびそれに及ぼす低体温処置の効果を示す図である。図中、Cはコントロール、即ち無処置ラット脳由来のcDNAを鋳型とした場合である。

【書類名】 図面

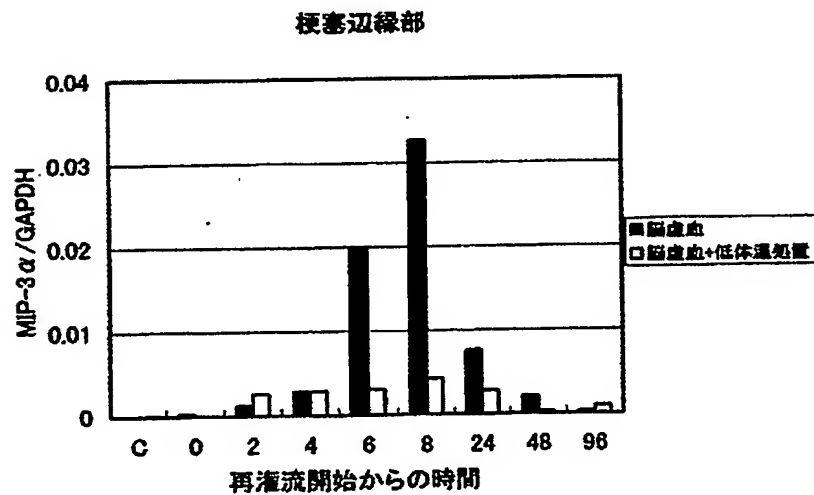
【図 1】

A



\* C:コントロール、無処置ラット脳由来cDNA

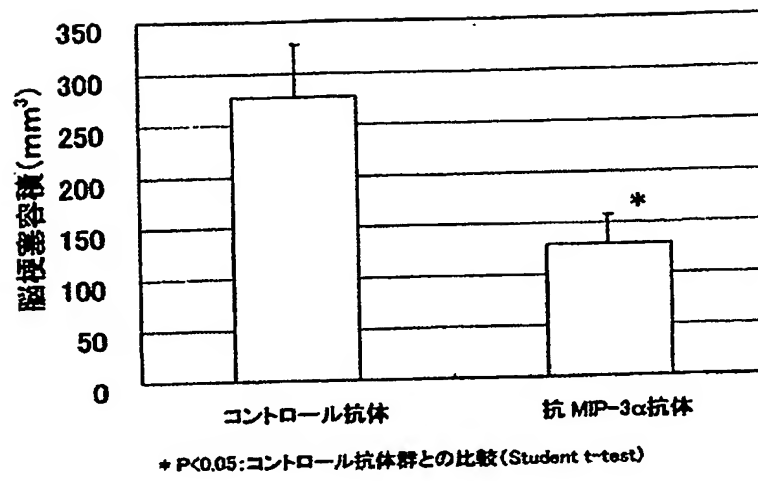
B



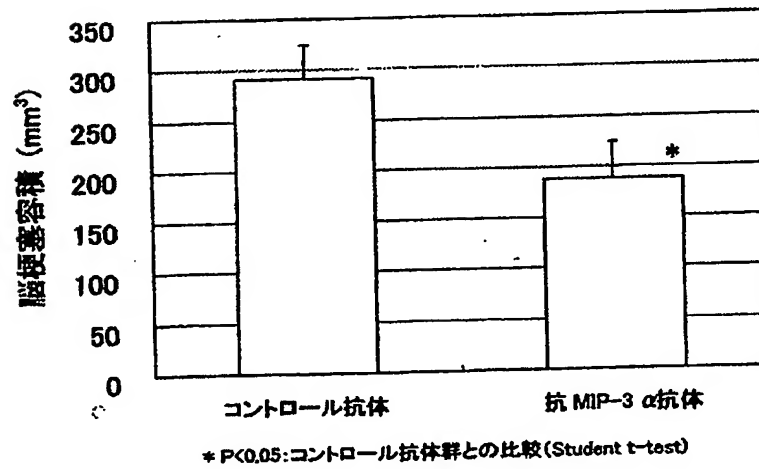
\* C:コントロール、無処置ラット脳由来cDNA

【図 2】

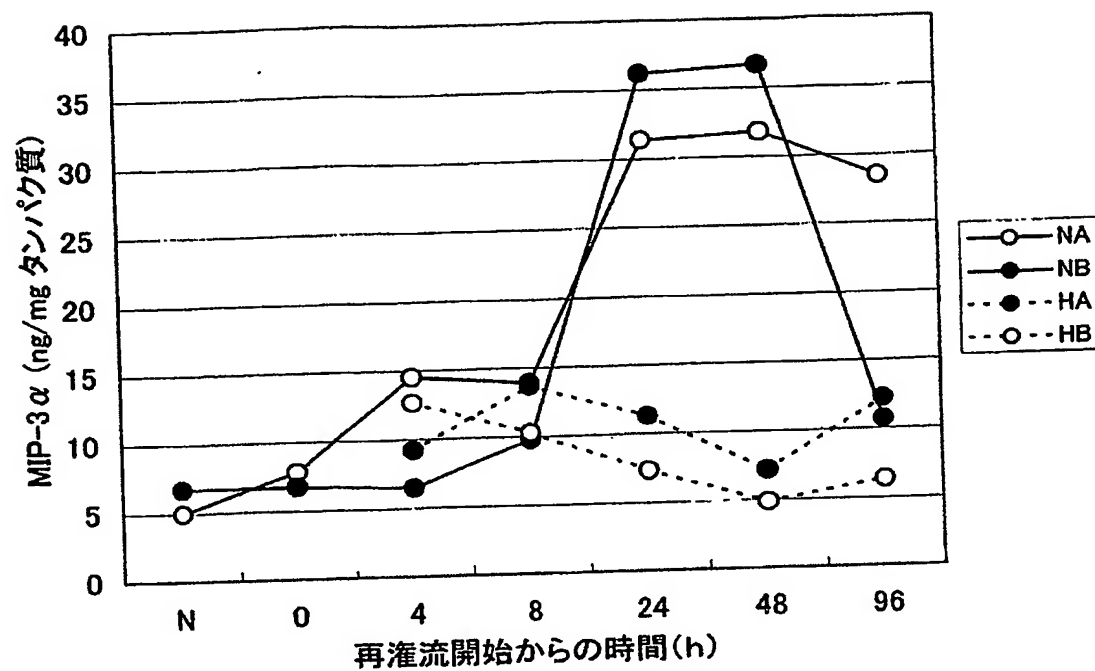
A



B



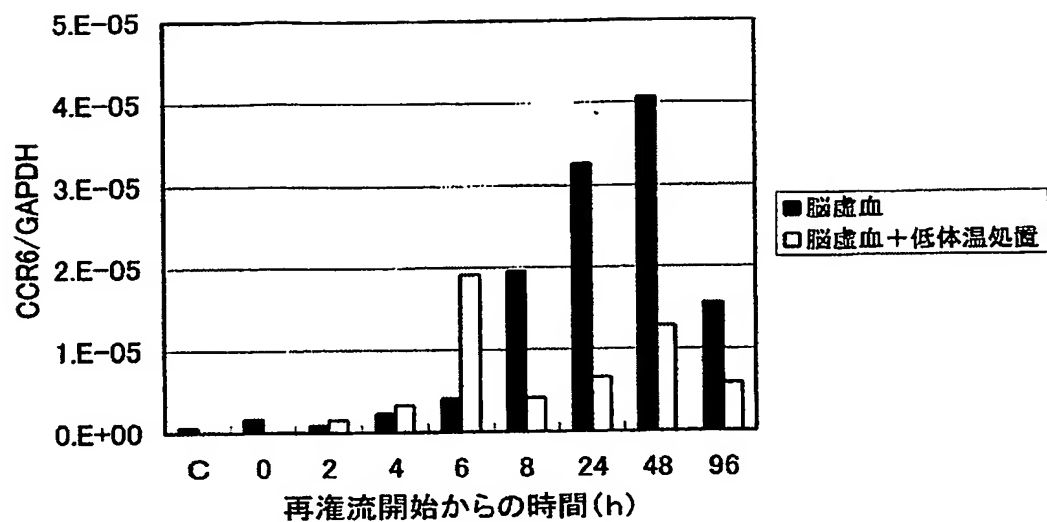
【図 3】



【図 4】

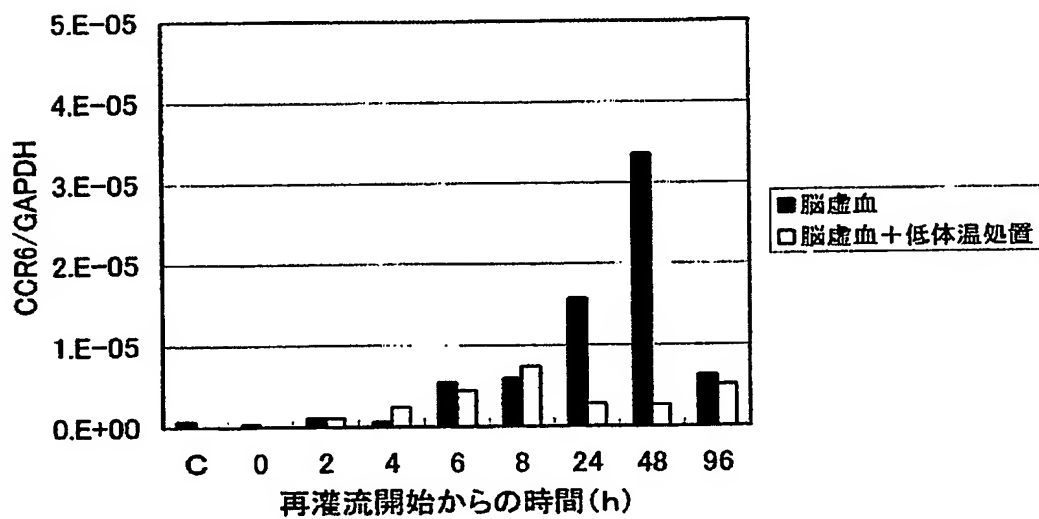
A

梗塞中心部



B

梗塞辺縁部



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 脳・神経細胞保護剤、特に脳血管障害または頭部外傷等による脳・神経細胞傷害に対する脳・神経細胞保護剤の提供。

【解決手段】 M I P - 3  $\alpha$  の発現および／または活性を低下させる物質、例えば、抗 M I P - 3  $\alpha$  抗体や M I P - 3  $\alpha$  のアンチセンス核酸を含有してなる脳・神経細胞保護剤、該抗体や M I P - 3  $\alpha$  をコードする核酸を含有してなる脳・神経細胞傷害の診断薬、M I P - 3  $\alpha$  および／または C C R 6、M I P - 3  $\alpha$  または C C R 6 をコードする核酸、あるいは M I P - 3  $\alpha$  または C C R 6 に対する抗体を用いた脳・神経細胞保護作用を有する物質のスクリーニング方法、並びにそのためのキットなど。

【選択図】 なし

【書類名】 手続補正書（方式）  
【整理番号】 B03095  
【提出日】 平成15年 4月15日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【事件の表示】  
【出願番号】 特願2003-106247  
【補正をする者】  
【識別番号】 000002934  
【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社  
【代理人】  
【識別番号】 100114041  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 高橋 秀一

## 【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 発明者

【補正方法】 変更

## 【補正の内容】

## 【発明者】

【住所又は居所】 大阪府豊中市西緑丘2丁目9-1-501

【氏名】 新谷 靖

## 【発明者】

【住所又は居所】 大阪府豊中市長興寺南1丁目4-14-303

【氏名】 太田 浩之

## 【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市東灘区住吉山手2丁目6-1 2-E

【氏名】 寺尾 寧子

## 【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市西区井吹台西町3丁目21-18

【氏名】 清田 義弘

【その他】 筆頭発明者である新谷 靖の【住所又は居所】として、  
「大阪府豊中市緑丘2丁目9-1-501」と願書に記載しておりましたが、正しくは「大阪府豊中市西緑丘2丁目9-1-501」です。この誤記はパソコンの入力ミスによるものですので、上記の通り補正する次第です。

【プルーフの要否】 要



特願 2 0 0 3 - 1 0 6 2 4 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 2 9 3 4 ]

1. 変更年月日  
[変更理由]  
住 所  
氏 名

1 9 9 2 年 1 月 2 2 日  
住所変更  
大阪府大阪市中央区道修町四丁目 1 番 1 号  
武田薬品工業株式会社